CYCLO-Trac® SP-Whole Blood

Radioimmunoassay for Cyclosporine

For the quantitative measurement of cyclosporine
(Cyclosporin A, Cyclosporin, Sandimmune®) in whole blood

Instruction Manual
Manuel d'Instructions
Testanleitung
Manual de Instrucciones
Manuale di Istruzioni
Manual de instruções
Bruksanvisning
Felhasználói Utasítás
Εγχειρίδιο οδηγιών

REF: 23000

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

CYCLO-TRAC® SP-WHOLE BLOOD ^{125}I RIA KIT

1. INTENDED USE

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

The CYCLO-Trac® SP Whole Blood radioimmunoassay (RIA) kit is intended for the quantitative measurement of cyclosporine (Cyclosporin A, Cyclosporin, Sandimmune®) in whole blood as an aid in the management of heart, kidney, and liver transplant patients receiving cyclosporine.

CAUTION: U.S. FEDERAL LAW RESTRICTS THIS DEVICE TO SALE AND DISTRIBUTION BY, OR ON THE ORDER OF, A PHYSICIAN, OR TO A CLINICAL LABORATORY; AND USE IS RESTRICTED TO, BY, OR ON THE ORDER OF, A PHYSICIAN. THE CYCLO-TRAC SP RIA KIT IS FOR USE ONLY WITH CYCLOSPORINE.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Cyclosporine (Cyclosporin A, Cyclosporin, Ciclosporin, Sandimmune) is a cyclic undecapeptide of fungal origin with powerful immunosuppressive properties.[1, 2] While its mechanism of action is still under investigation, cyclosporine appears to affect the metabolism of both T-helper lymphocytes and T-suppressor lymphocytes, which impairs the immune system.[3-5]

Though this drug has demonstrated utility in preventing the rejection of new organ transplants,[6-9] a number of adverse effects,[10,11] the most serious of which are nephro- and hepa-totoxicity associated with high blood levels of this drug,[12-16] have been reported. Moreover, absorption and metabolism of cyclosporine is highly variable from patient to patient.[17-19] Thus, dosages must be individualized and monitored to achieve optimal immunosuppression and minimize adverse side effects.[18,19] Nearly all of the cyclosporine present in whole blood is bound to red blood cells and plasma proteins.[20-22] This distribution is affected by changes in temperature and hematocrit.[21, 22] To ensure consistent results, a standardized protocol for blood collection is necessary.[19]

Two methods are currently available to monitor cyclosporine levels in patients: high performance liquid chromatography (HPLC) and radioimmunoassay (RIA). First generation RIA's employed polyclonal antibodies which exhibit high cross-reactivity with circulating metabolites.[23] Cyclosporine values generated by these RIA's invariably exceeded those generated by HPLC.[24] Second generation RIA's are based on monoclonal antibody technology.[25] Both specific and nonspecific monoclonal antibodies have been developed. The specific antibody measures only the parent compound of cyclosporine and generates values similar to those obtained by HPLC. The nonspecific antibody measures both parent compound and metabolites and produces results similar to those of first generation RIA's.[26]

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood RIA employs a specific monoclonal antibody that measures only cyclosporine and demonstrates no significant cross-reactivity with its metabolites. A methanol extraction step is required for the calibrators, controls, and samples prior to assay. The assay itself consists of a single incubation step and uses a double antibody phase separation technique. To simplify the procedure, the first antibody (mouse monoclonal specific to Cyclosporin A), and the second antibody (donkey anti-mouse) are premixed with a carrier (normal mouse serum) to produce a single reagent called Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

To determine cyclosporine levels with this kit, whole blood samples, calibrators, and controls are first extracted with methanol. The methanol extracts are then combined with Iodine-125 labeled cyclosporine tracer and Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Following a 1 hour incubation, the tubes are centrifuged, decanted, and then counted. The amount of radio-activity remaining in the pellet is inversely proportional to the concentration of cyclosporine found in the sample.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (BLUE) CYCLO-Trac SP Calibrators (0-6) CYCLO-Trac SP ImmunoSep CYCLO-Trac SP Tracer (RED) CYCLO-Trac SP Controls	1 vial/9 mL 1 vial/2 mL, 5 vials/1 mL 2 vials/100 mL 1 vial/20 mL 2 vials/1 mL
Number of tests	200

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After opening, store each reagent at 2-8°C until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blue): ready to use reagent
Donkey anti-mouse serum/normal mouse serum premix is diluted in phosphate-buffered saline containing 0.08% sodium azide and a surfactant. Blue dye is added. **Shake vigorously immediately before use.**

4.2 CYCLO-Trac SP Calibrators (0-6): ready to use reagent
Cyclosporine-free serum contains 0.1% sodium azide and a surfactant. Six cyclosporine calibrators, at nominal concentrations ranging from 0-1200 ng/mL, are prediluted in human serum containing 0.1% sodium azide and a surfactant. Exact concentration values are assigned according to each lot and appear on vial labels. The DiaSorin CYCLO-Trac SP calibrator has been calibrated against the USP Cyclosporine Reference Standard. Any comparison with other products or procedures should be done with this reference standard. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: ready to use reagent
Monoclonal mouse anti-cyclosporine antibody and donkey anti-mouse/normal mouse serum premix is diluted in phosphate-buffered saline containing 0.08% sodium azide and a surfactant. **Shake vigorously immediately before use**.

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (red): ready to use reagent
A derivative of cyclosporine is labeled with Iodine-125 and diluted in citrate-EDTA buffer which contains 0.05% sodium azide, human serum and a surfactant. Red dye is added.

4.5 CYCLO-Trac SP Controls (level 1 and level 2): ready to use reagent
Human serum is spiked with the appropriate amount of cyclosporine A to obtain a concentration within a specified range. Ranges for each lot are printed on the control vials included with each kit. 0.1% sodium azide and other stabilizers are added.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.
Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL
Treat as potentially infectious.
Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” 4th., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)
R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 9 µCi (333 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

6.1 The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.

6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.

6.3 A decrease in maximum binding.

6.4 A high nonspecific binding.

6.5 Poor reproducibility between duplicates.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

One hundred microliters of EDTA whole blood are required for the CYCLO-Trac SP whole blood extraction procedure.

NOTE: Heparinized samples should not be used.[19, 27]

COLLECTION AND STORAGE OF WHOLE BLOOD

Collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. EDTA (7.2 mg/ 5 mL blood) should be used as an anticoagulant. No further additives or preservatives are required to maintain the integrity of the sample. If specimens are not used immediately, store at 2-8°C or lower for up to 7 days. For prolonged storage (up to 3 months) freeze samples at -20°C or lower.[28, 29]

Whole blood samples that have been stored at 4°C, or have not been immediately processed, should be thoroughly mixed prior to taking samples for testing in the CYCLO-Trac SP whole blood kit.

8. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

8.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.

8.2 Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes.

8.3 Gamma scintillation counter capable of counting Iodine-125.

8.4 Vortex.

8.5 Pipetting devices:

- **a.** 400 µL, 100 µL and 50 µL positive displacement pipettes.
- **b.** Repeating dispensers calibrated to deliver 1.0 mL and 100 µL.

8.6 Methanol (HPLC grade).

8.7 Caps for extraction tubes (Scientific Products No. T1226-32).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Label one 12 x 75 glass test tube for each calibrator, control and unknown sample.

9.2 Dispense 400 µL of methanol (HPLC grade) into each tube using a positive displacement pipette.* Cover tubes with parafilm if samples are not yet ready to be added.

9.3 Add the calibrators, the controls and the whole blood samples into the methanol using a 100 µL positive displacement pipette.*

NOTE: Slowly dispense each sample with the pipette tip placed slightly under the surface of the methanol.

9.4 Immediately after the sample is added, cap each tube and vortex it for 15 seconds.

9.5 Centrifuge the capped tubes using 1600 x g** at 20-25°C for 5 minutes.

9.6 Take care not to allow the methanol extracts to evaporate before pipetting into the assay tubes.

9.7 Set-up labeled 12 x 75 mm test tubes according to the protocol Scheme of the Assay (back cover).

9.8 Allow reagents to equilibrate to room temperature (20-25°C) before using in the assay.

* Alternately, 200 µL of sample may be extracted with 800 µL of methanol.

** $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radius in cm) $(rpm)^2$

9.9 Add reagents as follows:

a. Total count tubes
100 µL of ^{125}I CYCLO-Trac SP (red)

b. Nonspecific binding tubes (NSB)
50 µL of extracted 0 calibrator
100 µL of ^{125}I CYCLO-Trac SP (red)
1.0 mL of thoroughly mixed CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blue)

c. CYCLO-Trac SP 0 calibrator
50 µL of extracted CYCLO-Trac SP 0 Calibrator
100 µL of ^{125}I CYCLO-Trac SP (red)

d. CYCLO-Trac SP calibrators (A-E)
50 µL of extracted CYCLO-Trac calibrator
100 µL of ^{125}I CYCLO-Trac SP (red)

e. Control and unknown samples
50 µL of extracted sample
100 µL of ^{125}I CYCLO-Trac SP (red)

9.10 Shake the bottle of Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep vigorously; immediately add 1.0 mL of well-mixed reagent to all tubes except the total count and NSB tubes.

9.11 Vortex the tubes vigorously and incubate them for 1 hour at 20-25°C.

9.12 Centrifuge the tubes using 1600 x g* for 20 minutes at 20-25°C.

9.13 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a maximum time of 2 minutes. Blot the tubes on absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning tubes upright.

9.14 Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for a sufficient time to achieve statistical accuracy (see Limitations of Procedure section).

10. PROCEDURAL COMMENTS

10.1 In order to obtain maximum accuracy and precision, the methanol extraction steps must be carefully followed; positive displacement pipettes (SMI) must be used to dispense both the methanol and the samples. Positive displacement pipettes are also required for transferring 50 µL of methanol extract to each assay tube.

10.2 Add each aliquot of reagent to the lower third of assay tube to ensure complete mixture of reagents.

10.3 Some manufacturers' disposable tubes may yield elevated nonspecific bindings or cause increased pellet slippage.

10.4 ImmunoSep reagents must be vigorously mixed immediately before use.

10.5 If a sample reads greater than the highest calibrator, re-extract the sample using a blood: methanol ratio greater than 1:4 (1:9 or 1:19 are recommended). Multiply the assay results by the appropriate correction factor.

10.6 If the tubes cannot be decanted within 5 minutes after the centrifuge has stopped, it is recommended to re-centrifuge the tubes.

10.7 Run the assay immediately after the extraction step.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radius in cm) $(rpm)^2$

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two control samples in every assay to ensure the validity of each assay's results. If you are using unassayed controls and have not established a mean and standard deviation, a mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ±2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the controls included with this kit. These ranges are printed on the control vials. It is not recommended that kit reagents be interchanged with the exception of ^{125}I CYCLO-Trac SP tracer.

In order for a laboratory to completely monitor the consistent performance of an RIA assay, there are additional factors which must be checked. DiaSorin suggests a regular check of the following parameters to assure consistent kit performance.

a. Total Counts

b. Maximum Binding
Counts per minute (CPM) of 0 Calibrator Tube/Average CPM of Total Count Tubes.

c. Nonspecific Binding
CPM of NSB Tube/Average CPM of Total Count Tubes.

d. Slope of Calibrator Curve
For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the calibrator line for run-to-run reproducibility.

12. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIA's. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against the concentrations of the calibration calibrators. The curve for the CYCLO-Trac SP assay is obtained by plotting % B/B_0 vs. log concentration.

12.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control and patient sample.

12.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts to obtain the corrected CPM.

12.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control or patient sample by the corrected CPM of the 0 calibrator.

$$\% \; B/B_0 = \frac{\text{CPM of calibrator or patient sample – CPT of NSB}}{\text{CPM of 0 calibrator – CPM of NSB}} \times 100$$

12.4 Using three cycle semi-log graph paper, plot % B/B_0 of the calibrators (Y-axis) against their corresponding concentration (X-axis).

12.5 Draw a best-fit curve through the points.

12.6 Interpolate cyclosporine concentrations of the patient samples from the calibrator curve.

In practice, most laboratories will employ a computer based data reduction system. DiaSorin recommends using either a spline or 4-parameter logistic (4PL) curve fitting program.

NOTE: DO NOT use a linear concentration scale (X-axis) and or a logit B/B_0 scale (Y-axis).

REDUCTION DATA

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

TABLE I

DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent Bound (B/T)	Percent (B/B_0)	Conc. (ng/mL)
Total Count	51045	50892				
	50738					
NSB	1221	1328		2.6		
	1434					
0 Calibrator	25323	25432	24104	50.0		
	25541					
Calibrators (ng/mL)						
A (20)	22781	22806	21478		89.1	
	22830					
B (61)	19850	19624	18296		75.9	
	19397					
C (154)	14843	14911	13583		56.4	
	14978					
D (379)	9506	9570	8242		34.2	
	9633					
E (1099)	4893	4858	3530		14.6	
	4823					
Unknown Samples						
1	16225	16122	14794		61.4	126
	16019					
2	9764	9570	8242		34.2	379
	9375					

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE I and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

CYCLO-Trac® SP WHOLE BLOOD SAMPLE CALIBRATOR CURVE

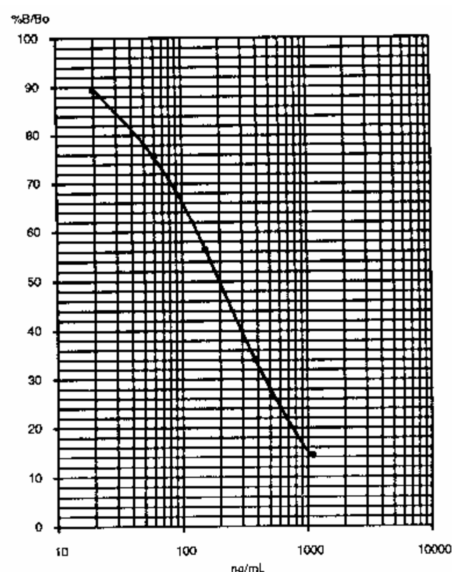


FIGURE 1

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

13.1 Specimens should not be repeatedly frozen and thawed.

13.2 Counting times should be sufficient to prevent statistical error.

13.3 Monoclonal antibodies such as OKT3 have been evaluated and shown not to interfere in the assay.

14. EXPECTED VALUES

Therapeutic blood levels for cyclosporine in kidney, heart, and liver transplant patients have not been well established. This has in part been due to the varied treatment protocols for transplantation practiced, the methods available for measuring cyclosporine and the concomitant administration of other immunosuppressive medications with cyclosporine.[19, 30, 31]

A clinical evaluation using the CYCLO-Trac SP Whole Blood kit was conducted at the University Hospitals of London, Ontario and Albany, New York, in kidney, heart, and liver transplant patients. These evaluations measured temporal trough cyclosporine blood levels in transplant patients. Trough blood values were observed post transplant from 4 days to 90 days in kidney (n = 10), heart (n = 10), and liver (n = 10) transplant patients at the University Hospital, London Ontario. In addition, a similar evaluation was conducted with kidney transplant patients (n = 18) at University Hospital, Albany, New York. At Albany, trough blood levels were observed from transplant to 199 days post transplant.

TABLE II shows the mean cyclosporine blood values and significant events (rejection or nephrotoxicity) observed in transplant patients from the University Hospital, London, Ontario. At this center, patients' blood levels were maintained at 400 to 650 ng/mL cyclosporine depending upon transplant type and clinical condition of the patients.

TABLE II

Temporal cyclosporine whole blood values in kidney, heart and liver transplant patients as measured by the CYCLO-Trac SP Whole Blood Kit.

Post Operative Day	Kidney[a] CyA (ng/mL)				Heart[b] CyA (ng/mL)				Liver[c] CyA (ng/mL)			
	N	Event[d]	Mean	S.D.	N	Event[d]	Mean	S.D.	N	Event[d]	Mean	S.D.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Total events		24				13				3		

[a] Cyclosporine: 3.75 mg/kg to 5 mg/kg I.V. changing to 12 mg/kg in two divided doses as soon as possible, prednisone 2-5 mg/kg with taper to 20 mg/day, methylprednisolone 1-2 mg/kg. If no kidney function, cyclosporine was discontinued and OKT3 given 5 mg/kg for 10 days.

[b] Cyclosporine begun 3rd post operative day 5 mg/kg in two divided doses, prednisone 15 mg daily taper gradually, azathioprine in addition as indicated, ALG 50 mg/kg given once and continued only as indicated, OKT3 5 mg/kg I.V. for 7 days as indicated.

[c] Cyclosporine given I.V. initially with oral dose started at day 5 at 4 mg/kg and maintained at desired blood level, prednisone 15 mg daily decreasing gradually, azathioprine 2-2.5 mg/kg and discontinued when platelets begin to fall, methylprednisolone 500 mg intraoperatively and 15 mg I.V. for 10 days, OKT3 5 mg/kg for 10 days.

[d] Nephrotoxicity or rejection.

TABLE III shows the mean cyclosporine blood values and corresponding creatinine levels in 18 kidney transplant patients from the University Hospital, Albany, New York.[32] At Albany, patients were maintained at 100 to 300 ng/mL trough cyclosporine level.

TABLE III

Temporal cyclosporine whole blood values in 18 kidney transplant patients as measured by the CYCLO-Trac SP Whole Blood Kit.

	Post Operative[a]	Cyclosporine ng/mL)			Creatinine Levels (mg/dL)				
Week	Day	N[b]	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	MIN	MAX
1	0-7	12	151	128	143	4.9	4.0	0.7	18.0
2	8-14	16	185	96	125	2.7	2.2	1.1	8.2
3	15-21	19	173	94	94	2.7	1.9	1.1	9.4
4	22-28	17	198	146	76	3.0	1.9	1.1	8.5
5	29-35	22	210	168	70	2.9	1.7	1.2	8.2
6	36-42	17	164	63	68	2.5	1.1	1.1	5.6
7	43-49	14	175	53	55	2.4	1.1	1.1	5.4
8	50-56	17	198	99	42	2.1	1.0	1.2	5.4
9	57-63	16	176	54	40	3.1	2.7	1.0	10.9
10	64-70	4	199	59	34	3.5	3.3	0.9	11.7
11	71-77	18	146	73	27	3.0	3.1	0.9	11.1
12	78-84	5	142	76	18	3.5	3.3	1.1	11.2
13	85-91	1	304	-	7	4.2	0.3	3.6	4.6
14	92-98	1	317	-	10	3.4	1.1	1.7	4.8
15	99-105	2	121	10	9	4.1	1.6	2.0	5.5
16	106-112	1	49	-	5	5.4	2.5	1.7	8.7
17	113-119	1	79	-	3	1.6	0.1	1.6	1.7

[a] Patients treated with cyclosporine 2-5 mg/kg (at twelve hour intervals), azathioprine 4 mg/kg preoperatively and tapered to 0.75 to 1.0 mg/kg, and methylprednisolone given as a 300 mg bolus and then adjusted to 20 mg/day by 30 days post transplant and 10 mg/day by 60 days post transplant.

[b] Individual cyclosporine determinations.

The results of these studies demonstrate that cyclosporine blood levels were maintained at desired blood levels for each transplant type as indicated for the transplant protocols utilized by each center.

Because cyclosporine can produce different blood levels in different patients, interpretation of results and adjustment of cyclosporine dosage must take into consideration post transplant period, other medications administered and relevant clinical information concerning the patient.

DRUG INTERACTIONS

The following is reported by Sandoz LTD., Basle Switzerland for the drug Sandimmune® (cyclosporine):

Cyclosporine is extensively metabolized by the liver. Therefore, its whole blood level may be influenced by drugs that affect the hepatic microsomal enzymes, particularly the cytochrome P-450 system. Substances known to inhibit these enzymes will decrease hepatic metabolism and increase cyclosporine whole blood levels. Drugs that have been reported to increase the whole blood concentration of cyclosporine include danazol, ketoconazole, erythromycin, nicardipine, diltiazem, methyl-testosterone, and oral contraceptives. Substances that are inducers of cytochrome P-450 activity will increase hepatic metabolism and decrease cyclosporine whole blood levels.

Drugs that have been reported to decrease the whole blood concentration of cyclosporine include rifampin, phenytoin, phenobarbital, I.V. trimethoprim with sulfamethoxazole, and carbamazepine. Monitoring of blood levels of cyclosporine and appropriate dosage adjustment are essential when these drugs are used concomitantly.

It has been found that prednisolone clearance is reduced in patients treated with cyclosporine and that whole blood levels of cyclosporine, as measured by RIA, increase following the administration of high dose methylprednisolone.

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Precision

Within-assay variation (values = ng/mL)

	Mean Value	S.D.	%C.V.	N
LOW	46	4.9	10.7	25
MEDIUM	186	6.0	3.2	25
HIGH	625	19.2	3.1	25

Between-assay variation results from multi-center proficiency study using whole blood samples.

	Mean Cyclosporin (ng/mL)	S.D.	%C.V.	N
Center 1*	91	15.0	16.5	5
	203	27.9	13.7	5
	543	53.7	9.9	5
Center 2	71	6.7	9.5	5
	173	12.9	7.58	5
	466	41.5	8.9	5
Center 3	78	5.4	6.8	5
	195	18.4	9.4	5
	500	50.2	10.0	5
Center 4	87	6.9	7.9	5
	200	13.5	6.8	5
	505	42.5	8.4	5
Center 5	78	3.6	4.6	5
	192	10.2	5.3	5
	497	23.9	4.8	5

* Indicates between assay variation seen in a laboratory just beginning to run radioimmunoassays.

15.2 TRUENESS: THE ASSAY TRUENESS HAS BEEN CHECKED BY THE LINEARITY TEST AND THE RECOVERY TEST.

Linearity (Parallelism)

Average recovery for 30 different serially diluted patient samples (concentration range 132-1716 ng/mL).

$$\% \text{ Recovery} = 100 \times \frac{\text{(dilution factor x value of diluted sample)}}{\text{(value of neat sample)}}$$

Dilution	1/2	1/4	1/8
% Recovery	96.1	93.3	95.9
S.D.	13.7	19.2	22.6
% C.V.	14.3	20.6	23.6

Accuracy

Recovery Study: Average recoveries at 3 levels of added cyclosporine for 5 samples, 6 replicates each (n=30).

	Added Cyclosporine (ng/mL)	% Recovery	S.D.	% C.V
Level 1	95	119	17	14
Level 2	212	109	11	10
Level 3	467	97	7	7

15.3 Analytical Sensitivity (Limits of Detection)

When defined as the apparent concentration at three standard deviations from the countsat maximum binding, the mean sensitivity of the CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay is 8.7 ng/mL (n=20).

15.4 Analytical Specificity

Average cross-reactivity of cyclosporine metabolites in the CYCLO-Trac SP Whole Blood assay. Cross-reactivity is defined as:

$$100 \times \frac{\text{(Cyclosporine concentration at 50\% } B/B_0\text{)}}{\text{(Metabolite concentration at 50\% } B/B_0\text{)}}$$

Cyclosporine Metabolite	**% Cross-reactivity**
1	1.7
8	<0.1
13	0.1
17	0.7
18	0.2
21	0.8

15.5 Interference

The following substances were spiked into aliquots of a whole blood pool containing cyclosporine (160-250 ng/mL). None of these substances interfered with cyclosporine measurement when present in concentrations listed below.

Substance	Concentration
Cholesterol	100-1000 mg/dL
Triglycerides	300-1000 mg/dL
Bilirubin	5-30 mg/dL
Azathioprine	50-200 ng/mL
Cimetidine	500-1000 ng/mL
Nifedipine	100-200 ng/mL
6-methyl-prednisolone	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

The following list of coadministered drugs have been tested at levels up to 100 µg/mL and found not to interfere with the assay:

Acetaminophen
N-Acetylprocainamide
Cephalosporine
Chloramphenicol
Digoxin
Disopyramide
Ethosuximide
Gentamycin Sulfate
Kanamycin
Lidocaine
Metoclopramide
Naficillin
Penicillin
Propranolol
Rifampin
Salicylic Acid
Tobramycin
Verapamil

Comparison of DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay to HPLC

Study	Transplant Type	Line Equation	Regression Coefficient	n
Pharmacokinetic	N/A	Y = 0.9121X + 47	r = 0.9719	373
University of Pennsylvania	Kidney Heart Liver	Y = 0.8022X + 34 Y = 0.9196X + 50 Y = 0.9572X + 48	r = 0.9585 r = 0.9223 r = 0.9067	82 42 40
Albany Medical Center	Kidney	Y = 1.038X + 27	r = 0.9124	187
University of Western Ontario	Kidney Heart Liver	Y = 1.3074X + 29 Y = 1.4672X + 16 Y = 1.3575X - 12	r = 0.9703 r = 0.9696 r = 0.9067	73 75 63

Correlation data presented represents the results of studies done in a number of laboratories using independently validated HPLC procedures. No comparison should be made to this data, and any comparison of methods should be done only after careful standardization of the methods has been achieved.

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE CYCLO-TRAC® SP-SANG TOTAL^{125}I

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

La trousse de dosage radio-immunologique (RIA) CYCLO-Trac® SP sang total permet la détermination quantitative de la cyclosporine (Cyclosporine A, Cyclosporine, Sandimmune®) dans le sang total pour aider à gérer les patients qui ont subi une transplantation de coeur, de rein ou de foie et qui sont soumis à un traitement de cyclosporine.

ATTENTION : D'APRES LA LOI FEDERALE AMERICAINE, LA VENTE ET LA DISTRIBUTION DE CET ARTICLE EST RESERVEE AUX MEDECINS OU AUX LABORATOIRES CLINIQUES, DIRECTEMENT OU SUR COMMANDE EXPRESSE ; L'UTILISATION DE CET ARTICLE EST RESERVEE AUX MEDECINS OU NE PEUT ETRE EFFECTUEE QUE SUR LEUR COMMANDE EXPRESSE. LA TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE CYCLO-TRAC SP NE PEUT ETRE UTILISEE QUE POUR LE DOSAGE DE LA CYCLOSPORINE.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

La cyclosporine (Cyclosporine A, Cyclosporine, Ciclosporine, Sandimmune) est un polypeptide cyclique provenant d'un champignon présentant de grandes propriétés d'immunosuppression.[1,2] Son action est aujourd'hui encore étudiée. Toutefois, la cyclosporine semble agir sur le métabolisme des cellules T auxiliaires et des cellules suppressives, qui affaiblit le système immunitaire.[3-5]

Bien que cette substance fasse preuve d'une grande utilité dans la prévention des rejets dans les transplantations d'organes,[6-9] elle présente des effets indésirables,[10,11] dont les plus importants sont la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité associées à un taux élevé de sang. [12-16] De plus, l'absorption et le métabolisme de la cyclosporine sont très variables d'un patient à l'autre.[17-19] C'est pourquoi les dosages doivent être individualisés et surveillés, de manière à obtenir une immunosuppression optimale et à réduire les effets indésirables.[18,19] Presque toute la cyclosporine présente dans le sang total est liée aux hématies et aux protéines du plasma.[20-22] Les changements de température et d'hématocrite affectent sa distribution.[21,22] Pour assurer des résultats constants, un protocole standard de prélèvement du sang doit être adopté.[19]

Il existe actuellement deux méthodes de surveillance du taux de cyclosporine chez les patients : la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et le dosage radio-immunologique (RIA). Les RIA de première génération utilisaient des anticorps polyclonaux qui présentaient une réactivité croisée élevée avec les métabolites en circulation.[23] Les valeurs de cyclosporine générées par ces RIA excédaient invariablement les valeurs obtenues par la méthode CLHP.[24] Les RIA de deuxième génération sont basés sur une technologie utilisant un anticorps monoclonal.[25] Les anticorps monoclonaux spécifiques et non spécifiques ont été développés. L'anticorps spécifique mesure uniquement le composé parent de la cyclosporine et génère des valeurs semblables à celles obtenues par CLHP. L'anticorps non spécifique mesure le composé parent et les métabolites. Ses résultats sont semblables à ceux des méthodes RIA de première génération.[26]

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le dosage radio-immunologique DiaSorin CYCLO-Trac SP sang total emploie un anticorps monoclonal spécifique qui mesure uniquement la cyclosporine et ne présente aucune réactivité croisée importante avec les métabolites. L'extraction au méthanol est nécessaire pour les étalons, les contrôles et les échantillons avant le dosage. Le dosage en soi consiste en une seule étape d'incubation et utilise une technique de séparation d'anticorps en deux phases. Pour simplifier la procédure, le premier anticorps (mono-clonal de souris spécifique à la Cyclosporin A), et le second anticorps (de singe anti-souris) sont prémélangés à l'aide d'un transporteur (sérum de souris normal) pour produire un seul réactif appelé Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

Pour déterminer le taux de cyclosporine à l'aide de cette trousse, les échantillons de sang total, les étalons et les contrôles sont d'abord extraits à l'aide de méthanol. Les extraits de méthanol sont ensuite combinés avec de l'iode-125 marqué par le traceur cyclosporine et l'Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Après 1 heure d'incubation, les tubes sont centrifugés, décantés puis comptés. La quantité de radioactivité restant dans la pastille est inversement proportionnelle à la concentration de cyclosporine présente dans l'échantillon.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

ImmunoSep CYCLO-Trac SP NSB (BLEU)	1 tube/9 mL
Etalons CYCLO-Trac SP (0-6)	1 tube/2 mL, 5 tubes/1 mL
ImmunoSep CYCLO-Trac SP	2 tubes/100 mL
Traceur CYCLO-Trac SP (ROUGE)	1 tube/20 mL
Contrôles CYCLO-Trac SP	2 tubes/1 mL
Nombre de dosages	200

CONSERVATION : Dès réception, la trousse doit être stockée entre 2 et 8°C. Après ouverture, conserver chaque réactif entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 ImmunoSep CYCLO-Trac SP NSB (bleu) : réactif prêt à l'emploi
Le prémélange de sérum anti-souris de singe/sérum de souris normal est dilué dans une solution saline de tampon phosphaté contenant 0,08% de nitrure de sodium et un surfactant. Un colorant bleu est ajouté. **Agiter vigoureusement juste avant l'usage.**

4.2 Etalons CYCLO-Trac SP (0-6) : réactif prêt à l'emploi
Le sérum exempt de cyclosporine contient 0,1% de nitrure de sodium et un surfactant. Six étalons de cyclosporine, à une concentration nominale allant de 0 à 1200 ng/mL, sont prédilués dans du sérum humain contenant 0,1% de nitrure de sodium et un surfactant. Les valeurs exactes de concentration sont assignées selon chaque lot et figurent sur les étiquettes des tubes. L'étalon DiaSorin CYCLO-Trac SP a été calibré selon le standard de référence USP Cyclosporine. Toute comparaison avec d'autres produits ou procédures de dosage doit être effectuée selon ce standard de référence. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons patient lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

4.3 ImmunoSep Anti-CYCLO-Trac SP : réactif prêt à l'emploi
Le prémélange d'anticorps monoclonal de souris anti-cyclosporine et le sérum anti-souris de singe/sérum de souris normal est dilué dans une solution saline de tampon phosphaté contenant 0,08% de nitrure de sodium et un surfactant. **Agitez vigoureusement juste avant l'emploi**.

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (rouge) : réactif prêt à l'emploi
Un dérivé de cyclosporine est marqué avec de l'iode-125 et dilué dans un tampon de citrate et EDTA contenant 0,05% de nitrure de sodium, du sérum humain et un surfactant. Un colorant rouge est ajouté.

4.5 Contrôles CYCLO-Trac SP (niveau 1 et niveau 2) : réactif prêt à l'emploi
Du sérum humain est dopé avec la quantité appropriée de cyclosporine A, de manière à obtenir une concentration comprise dans un intervalle spécifique. Les intervalles de chaque lot sont imprimés sur les tubes de contrôle inclus dans chaque trousse. 0,1% de nitrure de sodium et d'autres stabilisateurs sont ajoutés.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.
Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAG, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (HBV) de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” 4 mai 1999 ou dernière édition.

RÉACTIFS CONTENANT DU NITRURE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent du nitrure de sodium. Le nitrure de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation de nitrure. Pour plus d'informations, consulter “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,” dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA,.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)
R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.
R 32 - Un contact avec les acides dégage des gaz très toxiques.
S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 9 µCi (333kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.

5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'une produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radio-activité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

6.1 Présence de particules dangereuses anormales dans l'un des réactifs.

6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.

6.3 Diminution de la liaison maximale.

6.4 Haute liaison non spécifique.

6.5 Mauvaise reproductibilité entre les doubles.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Cent microlitres d'EDTA sang total sont nécessaires pour la procédure d'extraction du CYCLO-Trac SP sang total.

REMARQUE : Les échantillons héparinisés ne doivent pas être utilisés.[19, 27]

PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DU SANG TOTAL

Prélevez du sang par ponction veineuse dans un tube de verre à vide de 5 ou 10 mL. Utilisez de l'EDTA (7,2 mg/5 mL sang) comme anticoagulant. Aucun autre additif ou conservateur n'est nécessaire pour préserver l'intégrité de l'échantillon. Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, les conserver à une température de 2 à 8°C ou plus bas jusqu'à 7 jours. Pour une conservation plus longue (jusqu'à 3 mois), congelez les échantillons à -20°C ou plus bas.[28, 29]

Les échantillons de sang qui ont été conservés à 4°C ou qui n'ont pas été immédiatement traités doivent être bien agités avant d'être utilisés pour le test de la trousse CYCLO-Trac SP sang total.

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

8.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.

8.2 Centrifugeuse à thermostat pour tubes 12 x 75 mm.

8.3 Compteur à scintillation gamma en mesure de compter l'iode-125.

8.4 Vortex.

8.5 Pipettes :

- **a.** 400 µL, 100 µL et 50 µL macropipette à volume variable.
- **b.** Distributeurs à répétition calibrés pour délivrer 1,0 mL et 100 µL.

8.6 Méthanol (degré CLHP).

8.7 Bouchons pour les tubes d'extration (Scientific Products No. T1226-32).

9. PROCÉDURE DE DOSAGE

9.1 Marquez un tube à essai de verre 12 x 75 pour chaque étalon, contrôle et échantillon à déterminer.

9.2 Dispensez 4000 µL de méthanol (degré CLPH) dans chaque tube à l'aide d'une macropipette à volume variable.* Couvrez les tubes avec du parafilm si les échantillons ne sont pas prêts à être ajoutés.

9.3 Ajoutez les étalons, les contrôles et les échantillons de sang total dans le méthanol à l'aide d'une macropipette à volume variable 100 µL.*

REMARQUE : Dispensez lentement chaque échantillon avec la pointe de la pipette placée légèrement sous la surface de méthanol.

9.4 Dès que vous avez ajouté l'échantillon, bouchez le tube et mélangez-le sur le Vortex pendant 15 secondes.

9.5 Centrifugez les tubes fermés à 1600 x g** et 20-25°C pendant 5 minutes.

9.6 Veillez à ce que les extraits de méthanol ne s'évaporent pas avant le pipetage dans les tubes à essai.

9.7 Installez les tubes à essai marqués 12 x 75 mm selon le Profil de dosage (dos du manuel).

9.8 Laissez les réactifs atteindre la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser pour le dosage.

9.9 Ajoutez les réactifs comme suit :

a. Tubes de numération totale
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rouge)

b. Tubes de liaison non spécifique (NSB)
50 µL d'étalon 0 extrait
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rouge)
1,0 mL d'ImmunoSepCYCLO-Trac SP NSB (bleu) bien mélangé

c. étalon 0 CYCLO-Trac SP
50 µL d'étalon 0 extrait CYCLO-Trac SP
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rouge)

d. étalons CYCLO-Trac SP (A-E)
50 µL d'étalon CYCLO-Trac extrait
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rouge)

e. Contrôle et échantillons à déterminer
50 µL d'échantillon extrait
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rouge)

9.10 Agitez vigoureusement le flacon d'ImmunoSep Anti-CYCLO-Trac SP I ; ajoutez immédiatement 1,0 mL de réactif bien mélangé à tous les tubes, à l'exception des tubes de numérotation totale et de NSB.

9.11 Mélangez vigoureusement les tubes sur le Vortex est laissez-les incuber pendant 1 heure à 20-25°C.

9.12 Centrifugez les tubes à 1600 x g* pendant 20 minutes à 20-25°C.

9.13 Décantez immédiatement le surnageant de tous les tubes, à l'exception des tubes à numérotation totale, en les renversant pendant 2 minutes au maximum. Tapez les tubes sur du papier absorbant pour éliminer les gouttes de liquide qui restent sur les bords avant de les replacer à l'endroit.

9.14 A l'aide du compteur à scintillation gamma, comptez le précipité de chaque tube et des tubes à numération totale le temps nécessaire à atteindre l'exactitude statistique suffisante (consultez le paragraphe Limitations de la Procédure).

* En alternative, vous pouvez extraire 200 µL d'échantillon à l'aide de 800 µL de méthanol.

** $g = (1118 \times 10^{-8})$ (rayon en cm) $(\text{rpm})^2$

10. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

10.1 Pour obtenir la plus grande exactitude et la meilleure précision, suivez scrupuleusement les étapes d'extraction du méthanol ; utilisez des macro-pipettes à volume variable (SMI) pour dispenser le méthanol et les échantillons. Utilisez également les macropipettes à volume variable pour transférer 50 µL d'extrait de méthanol dans chaque tube à essai.

10.2 Ajoutez chaque part de réactif dans le tiers inférieur du tube à essai, de manière à assurer le mélange complet des réactifs.

10.3 Les tubes jetables de certains fabricants pourraient provoquer des liaisons non spécifiques élevées ou faire trop glisser les pastilles.

10.4 Agitez vigoureusement les réactifs ImmunoSep avant l'emploi.

10.5 Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être extrait une nouvelle fois en utilisant une proportion de sang et de méthanol supérieure à 1:4 (1:9 ou 1:19 sont recommandés). Multipliez les résultats du dosage par le facteur de correction approprié.

10.6 Si les tubes be peuvent pas être décantés dans les 5 minutes qui suivent la fin de la centrifugation, il est recommandé de les centrifuger à nouveau.

10.7 Effectuez le dosage dès la fin de l'extraction.

11. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux échantillons de contrôle dans chaque dosage pour garantir la validité de leurs résultats. Si vous utilisez des contrôles non dosés et que vous n'avez pas établi de moyenne ni de déviation standard, il vous faudra déterminer une moyenne et une déviation standard pour chaque contrôle à l'aide de dix dosages au moins. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces contrôles en utilisant l'écart-type ±2 par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le DiaSorin Quality Control Laboratory a déterminé un intervalle pour les contrôles fournis dans cette trousse. Ces intervalles sont imprimés sur les tubes de contrôle. Il est déconseillé d'interchanger les réactifs de la trousse, à l'exception du traceur ^{125}I CYCLO-Trac SP.

Pour qu'un laboratoire puisse surveiller entièrement la constance des performances d'un dosage RIA, certains facteurs supplémentaires doivent être vérifiés. DiaSorin suggère un contrôle régulier des paramètres suivants pour garantir la précision constante de la trousse.

a. Activité totale

b. Liaison maximale

Coups par minute (CPM) du tube de calibrateur 0 /Moyenne des CPM des tubes de numération totale.

c. Liaison non spécifique

CPM du tube NSB/Moyenne des CPM des tubes de numération totale.

d. Pente de la courbe d'étalonnage

Surveiller par exemple les points 80, 50 et 20% de la ligne de l'étalon pour la reproductibilité d'un dosage à l'autre.

12. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en déterminant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations des étalons. La courbe pour le dosage CYCLO-Trac SP est obtenue en déterminant le % B/B_0 et de diagramme de concentration.

12.1 Calculez la moyenne des CPM pour chaque étalon, contrôle et échantillon de patient.

12.2 Soustrayez la moyenne des CPM des tubes NSB de tous les comptes pour obtenir les CPM corrigés.

* g = (1118×10^{-8}) (rayon en cm) $(\text{rpm})^2$

12.3 Divisez les CPM corrigés de chaque étalon, contrôle ou échantillon de patient par les CPM corrigés de l'étalon 0.

$$\% \ B/B_0 = \frac{\text{CPM de l'étalon ou échantillon de patient – CPT de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0 – CPM de NSB}} \times 100$$

12.4 A l'aide de papier semi-logarithmique à trois cycles, déterminez le % B/B_0 des étalons (axe des Y) et leur concentration correspondante (axe des X).

12.5 Tracez une courbe la plus précise possible entre les points.

12.6 Interpolez la concentation de cyclosporine des échantillons du patient sur la courbe d'étalonnage.

Dans la pratique, la plupart des laboratoires utiliseront un système informatique de réduction des données. DiaSorin conseille d'utiliser un programme de courbe “spline” ou “4PL”.

REMARQUE : N'UTILISEZ ni une échelle de concentration linéaire (axe des X), ni une échelle logit B/B_0 (axe des Y).

DONNÉES DE RÉDUCTION

Le laboratoire QC DiaSorin utilise un programme “smoothed spline curve”.

TABLEAU I
Données de l'échantillon de sang total DiaSorin CYCLO-Trac SP

Tube	CPM double	CPM moyen	CPM corrigé	% lié (B/T)	% (B/B_0)	graph. (ng/mL)
Activité totale	51 045	50 892				
	50 738					
NSB	1 221	1 328		2,6		
	1 434					
Calibrateur 0	25 323	25 432	24 104	50,0		
	25 541					
Calibrateurs (ng/mL)						
A (20)	22 781	22 806	21 478		89,1	
	22 830					
B (61)	19 850	19 624	18 296		75,9	
	19 397					
C (154)	14 843	14 911	13 583		56,4	
	14 978					
D (379)	9 506	9 570	8 242		34,2	
	9 633					
E (1099)	4 893	4 858	3 530		14,6	
	4 823					
Échantillons à déterminer						
1	16 225	16 122	14 794		61,4	126
	16 019					
2	9 764	9 570	8 242		34,2	379
	9 375					

Des données d'échantillons typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU I et à la FIGURE 1 ; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

Courbe d'étalonnage de l'échantillon de sang total CYCLO-Trac® SP

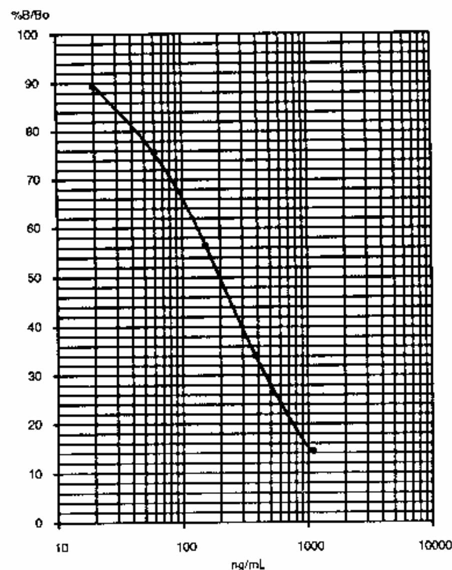


FIGURE 1

13. LIMITES DU DOSAGE

13.1 Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés plusieurs fois.

13.2 Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique.

13.3 Les anticorps monoclonaux comme OKT3 ont été évalués et n'ont pas présenté d'interférence avec le dosage.

14. VALEURS ATTENDUES

Les taux thérapeutiques de sang pour la cyclosporine dans les transplantations de rein, de coeur et de foie n'ont pas été bien établis. Cela est dû en partie aux modifications dans les protocoles de traitement pour les transplantations effectuées, aux méthodes disponibles pour le dosage de la cyclosporine et à l'administration concomitante d'autres traitements immunosuppresseurs associés à la cyclosporine.[19, 30, 31]

Une évaluation clinique à l'aide de la trousse CYCLO-Trac SP sang total a été conduite dans les hôpitaux universitaires de Londres, dans l'Ontario et d'Albany, dans l'état de New York, chez les patients ayant subi une transplantation de rein, de coeur et de foie. Ces évaluations ont mesuré une chute temporaire du taux de cyclosporine dans le sang chez les patients transplantés. Une chute de la valeur de sang a été observée entre 4 et 90 jours après l'intervention chez les patients ayant subi une transplantation de rein (n = 10), de coeur (n = 10) et de foie (n = 10) à l'hôpital universitaire de Londres, dans l'Ontario. De plus, une évaluation similaire a été conduite chez les patients ayant subi une transplantation de rein (n = 18) à l'hôpital universitaire d'Albany, dans l'état de New York. A Albany, une chute du niveau de sang a été observé dans une période allant de la transplantation à 199 jours après l'intervention.

Le TABLEAU II présente les valeurs moyennes de cyclosporine dans le sang et des événements significatifs (rejet ou néphrotoxicité) observés chez les patients transplantés à l'hôpital universitaire de Londres, dans l'Ontario. Dans ce centre, le taux de sang des patients était maintenu entre 400 et 650 ng/mL de cyclosporine selon le type de transplantation et les conditions cliniques des patients.

TABLEAU II

Valeurs temporaires de cyclosporine dans le sang total chez les patients ayant subi une transplantation de rein, de coeur et de foie mesurées par la trousse CYCLO-Trac SP sang total.

Post Opératoire Jour	Rein[a] CyA (ng/mL)				Coeur[b] CyA (ng/mL)				Foie[c] CyA (ng/mL)			
	N	Evén.[d]	Moyen.	S.D.	N	Evén.[d]	Moyen.	S.D.	N	Evén.[d]	Moyen.	S.D.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Evénements totaux		24				13				3		

[a] Cyclosporine : 3,75 mg/kg à 5 mg/kg I.V. devenu 12 mg/kg en deux doses divisées dès que possible, prednisone 2-5 mg/kg avec une pointe à 20 mg/jour, méthylprednisolone 1-2 mg/kg. En l'absence de fonction du rein, la cyclosporine a été suspendue et de l'OKT3 a été administré à une dose de 5 mg/kg pendant 10 jours.

[b] Cyclosporine commencée au troisième jour suivant l'intervention à une dose de 5 mg/kg en deux doses divisées, prednisone 15 mg par jour en augmentation progressive, avec ajout d'azathioprine comme indiqué, ALG 50 mg/kg administrée une fois et poursuivie selon les indications, OKT3 5 mg/kg I.V. pendant 7 jours, comme indiqué.

[c] Cyclosporine administrée I.V. d'abord par dose orale à partir du cinquième jour à une dose de 4 mg/kg et maintenue au niveau de sang voulu, prednisone 15 mg par jour en diminution progressive, azathioprine 2-2,5 mg/kg et interrompue lorsque les plaquettes ont commencé à baisser, méthylprednisolone 500 mg en intraopératoire et 15 mg I.V. pendant 10 jours, OKT3 5 mg/kg pendant 10 jours.

[d] Néphrotoxicité ou rejet.

Le TABLEAU III montre la moyenne des valeurs de cyclosporine dans le sang et le taux de créatinine correspondant chez 18 patients ayant subi une transplantation de rein à l'hôpital universitaire d'Albany, dans l'état de New York.[32] A Albany, les patients étaient maintenus à 100 et 300 ng/mL de chute du taux de cyclosporine.

TABLEAU III

Valeurs temporaires de cyclosporine dans le sang total chez 18 patients ayant subi une transplantation de rein mesuré par la trousse CYCLO-Trac SP sang total.

Semaine	Post Opératoire Jour	Cyclosporine (ng/mL)			Taux de créatinine (mg/dL)				
		N[b]	Moyenne	S.D.	N	Moyenne	S.D	MIN	MAX
1	0-7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8-14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15-21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22-28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29-35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36-42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43-49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50-56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57-63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64-70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71-77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78-84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85-91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92-98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99-105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106-112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113-119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[a] Patients traités par cyclosporine 2-5 mg/kg (à des intervalles de douze heures), azathioprine 4 mg/kg en préopératoire et une pointe de 0,75 à 1,0 mg/kg, et méthylprednisolone en doses de 300 mg bols puis modifié à 20 mg/jour pendant 30 jours après la transplantation et 10 mg/jour pendant 60 jours après la transplantation.

[b] Déterminations individuelles de cyclosporine.

Les résultats de ces études montrent que le taux de cyclosporine dans le sang est maintenu au taux voulu de sang pour chaque type de transplantation, comme indiqué pour les protocoles de transplantation adoptés par chaque centre.

La cyclosporine pouvant produire des taux de sang différents chez différents patients, l'interprétation des résultats et l'ajustement du dosage de cyclosporine doivent prendre en considération la période post-transplantation, les autres médicaments administrés et les informations cliniques importantes concernant le patient.

INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES

Sandoz LTD., Bâle, Suisse, reporte la remarque suivante concernant le médicament Sandimmune® (cyclosporine) :

La cyclosporine est largement métabolisée par le foie. Ainsi, son taux dans le sang total peut être influencé par des médicaments qui affectent les enzymes microsomaux hépatiques, en particulier le système cytochrome P-450.

Les substances qui inhibent ces enzymes réduiront le métabolisme hépatique et augmenteront le taux de cyclosporine dans le sang total. Les médicaments qui augmentent la concentration de cyclosporine dans le sang total incluent danazol,

cétoconazole, érythromycine, nicardipine, diltiazem, méthyltestostérone et les contraceptifs oraux. Les substances qui induisent l'activité du cytochrome P-450 augmenteront le métabolisme hépatique et diminueront le taux de cyclosporine dans le sang total.

Les médicaments qui diminuent la concentration sanguine de cyclosporine comprennent rifampine, phénytoïne, phénobarbital, I.V. triméthoprime avec sulfaméthoxazole et carbamazépine. La surveillance du taux sanguin de cyclosporine et l'ajustement approprié du dosage sont essentiels lorsque ces médicaments sont utilisés en concomitance.

Il est apparu que la clairance de prédnisolone est réduite chez les patients traités par cyclosporine et que les taux de cyclosporine dans le sang total mesurés par RIA, augmentent selon l'administration de doses élevées de méthylprednisolone.

15. CRITERES DE QUALITE

15.1 Précision

Variation intra-dosage (valeurs = ng/mL)

	Valeur moyenne	Ecart-type	%C.V.	N
BAS	46	4,9	10,7	25
MOYEN	186	6,0	3,2	25
ELEVE	625	19,2	3,1	25

Les variations entre essais sont dues à l'étude de compétence multi-centres des échantillons de sang total.

	Cyclosporine moyenne (ng/mL)	Ecart-type	%C.V.	N
Centre 1*	91	15,0	16,5	5
	203	27,9	13,7	5
	543	53,7	9,9	5
Centre 2	71	6,7	9,5	5
	173	12,9	7,58	5
	466	41,5	8,9	5
Centre 3	78	5,4	6,8	5
	195	18,4	9,4	5
	500	50,2	10,0	5
Centre 4	87	6,9	7,9	5
	200	13,5	6,8	5
	505	42,5	8,4	5
Centre 5	78	3,6	4,6	5
	192	10,2	5,3	5
	497	23,9	4,8	5

* Indique une variation intra-essai observée dans un laboratoire commençant tout juste à effectuer des dosages radio-immunologiques.

15.2 EXACTITUDE : L'EXACTITUDE DU DOSAGE A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR LE TEST DE LINÉARITÉ ET DE RÉCUPÉRATION.

Linéarité (parallélisme)

Récupération moyenne pour 30 échantillons de patients dilués en série (intervalle de concentration 132-1716 ng/mL).

$$\% \text{ Récupération} = 100 \times \frac{\text{(facteur de dilution x valeur de l'échantillon dilué)}}{\text{(valeur d'échantillon non dilué)}}$$

Dilution	1/2	1/4	1/8
% Récupération	96,1	93,3	95,9
Ecart-type	13,7	19,2	22,6
% C.V.	14,3	20,6	23,6

Exactitude

Etude de récupération : récupérations moyennes à 3 niveaux de cyclosporine ajoutée pour 5 échantillons, 6 répliqués chacun (n=30).

	Cyclosporine ajoutée (ng/mL)	% Récupération	Ecart-type	% C.V.
Niveau 1	95	119	17	14
Niveau 2	212	109	11	10
Niveau 3	467	97	7	7

15.3 Sensibilité analytique (limites de détection)

Lorsqu'elle est définie comme la concentration apparente à trois déviations standard des comptes à liaison maximale, la sensibilité moyenne du dosage CYCLO-Trac SP sang total est de 8,7 ng/mL (n=20).

15.4 Spécificité analytique

Moyenne de réactivité croisée des métabolites de cyclosporine dans le dosage CYCLO-Trac SP sang total. La réactivité croisée est définie comme :

$$100 \times \frac{\text{(Concentration de cyclosporine à 50\% } B/B_0\text{)}}{\text{(Concentration de métabolite à 50\% } B/B_0\text{)}}$$

Métabolite de cyclosporine	**% réaction croisée**
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Interférence

Les substances suivantes ont été dopées en fractions d'un ensemble de sang total contenant de la cyclosporine (160-250 ng/mL). Aucune de ces substances n'a provoqué d'interférences avec la détermination de cyclosporine dans les concentrations présentées ci-dessous.

Substance	Concentration
Cholestérol	100-1000 mg/dL
Triglycérides	300-1000 mg/dL
Bilirubine	5-30 mg/dL
Azathioprine	50-200 ng/mL
Cimétidine	500-1000 ng/mL
Nifédipine	100-200 ng/mL
6-méthyl-prednisolone	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

La liste suivante de médicaments co-administrés a été testée à des niveaux de 100 µg/mL. Ils n'ont présenté aucune interférence avec le dosage :

Acétaminophène	Lidocaïne
N-Acétylprocaïnamide	Métoclopramide
Céphalosporine	Naficilline
Chloramphénicol	Pénicilline
Digoxine	Propranolol
Disopyramide	Rifampine
Ethosuximide	Acide salycilique
Sulfate de gentamycine	Tobramycine
Kanamycin	Verapamil

Comparaison entre le dosage DiaSorin CYCLO-Trac SP sang total et la méthode CLHP

Etude	Type de transplantation	Equation de ligne	Coefficient de régression	n
Pharmacocinétique	N/A	Y = 0,9121X + 47	r = 0,9719	373
Université de Pennsylvanie	Rein Coeur Foie	Y = 0,8022X + 34 Y = 0,9196X + 50 Y = 0,9572X + 48	r = 0,9585 r = 0,9223 r = 0,9067	82 42 40
Centre médical d'Albany	Rein	Y = 1,038X + 27	r = 0,9124	187
Université de Western Ontario	Rein Coeur Foie	Y = 1,3074X + 29 Y = 1,4672X + 16 Y = 1,3575X - 12	r = 0,9703 r = 0,9696 r = 0,9067	73 75 63

Les données de corrélation proposées représentent les résultats des études conduites dans des laboratoires utilisant des procédures CLPH validées de manière indépendante. Aucune comparaison ne doit être faite entre ces données. Une comparaison entre les méthodes ne doit être appliquée qu'après établissement d'une standardisation méticuleuse des méthodes.

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE

CYCLO-TRAC® SP-WHOLE BLOOD ^{125}I RIA-KIT

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Der CYCLO-Trac® SP Whole Blood-Radioimmunoassay (RIA)-Kit ist für die quantitativen Bestimmung von Cyclosporin (Cyclosporin A, Cyclosporin, Sandimmune®) in Vollblut zur Unterstützung der Behandlung von Patienten mit Herz-, Nieren- und Lebertransplantation gedacht, die Cyclosporin erhalten.

ACHTUNG: LAUT BUNDESRECHT DER USA DARF DIESES GERÄT NUR AN EINEN ARZT ODER AUF ANWEISUNG EINES ARZTES ODER AN EIN KLINISCHES LABOR VERKAUFT UND NUR VON EINEM ARZT ODER AUF ANWEISUNG EINES ARZTES VERWENDET WERDEN. DAS CYCLO-TRAC SP RIA-KIT DARF NUR ZUSAMMEN MIT CYCLOSPORIN VERWENDET WERDEN.

2. ÜBERBLICK UND ERKLÄRUNG

Cyclosporin (Cyclosporin A, Cyclosporin, Ciclosporin, Sandimmune) ist ein zyklisches Undekapeptid aus einem Pilz mit stark immunosuppressiven Eigenschaften.[1, 2] Der eigentliche Wirkungsmechanismus wird noch untersucht, es scheint jedoch so zu sein, dass Cyclosporin sowohl auf den Stoffwechsel der T-Helferlymphozyten als auch auf den der T-Suppressorlymphozyten wirkt, die das Immunsystem beeinträchtigen.[3-5]

Obwohl das Medikament erfolgreich gegen die Abstoßung von transplantierten Organen wirkt,[6-9] wurden verschiedene Nebenwirkungen festgestellt,[10,11] die gravierendsten sind Nephrotoxizität und Hepatoxizität bedingt durch den hohen Spiegel des Medikaments im Blut.[12-16] Außerdem variiert die Aufnahme von Cyclosporin und sein Abbau durch den Stoffwechsel in starkem Maße von Patient zu Patient.[17-19] Deshalb muss die Dosierung individuell angepasst und überwacht werden, um eine optimale Immunsuppression zu erreichen und die Nebenwirkungen zu minimieren.[18,19] Fast das gesamte Cyclosporin im Vollblut wird durch die roten Blutzellen und die Plasmaproteine gebunden.[20-22] Die Verteilung hängt von Veränderungen des Temperatur- und des Hämatokritwerts ab.[21, 22] Um konsistente Ergebnisse zu erzielen, ist ein Standardprotokoll für die Blutentnahme erforderlich.[19]

Zurzeit gibt es zwei Verfahren zur Überwachung des Cyclosporin-Spiegels bei Patienten: die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) und den Radioimmunoassay (RIA). Bei der ersten Generation von RIAs wurden polyklonale Antikörper verwendet, die eine hohe Kreuzreaktivität mit den zirkulierenden Stoffwechselprodukten zeigten.[23] Die bei diesen RIAs erzeugten Cyclosporin-Werte überstiegen stets die bei der HPLC erzeugten Werte.[24] Die zweite Generation von RIAs basiert auf einem Verfahren mit monoklonalen Antikörpern.[25] Es wurden sowohl spezifische als auch nichtspezifische Antikörper entwickelt. Der spezifische Antikörper misst nur die Elternkomponente des Cyclosporins und erzeugt ähnliche Werte wie die HPLC. Der nichtspezifische Antikörper misst sowohl die Elternkomponente als auch die Stoffwechselprodukte und liefert ähnliche Ergebnisse wie die RIAs der ersten Generation.[26]

3. TESTPRINZIP

Beim CYCLO-Trac SP Whole Blood RIA von DiaSorin wird ein spezifischer monoklonaler Antikörper eingesetzt, der nur das Cyclosporin misst und keine signifikante Kreuzreaktivität mit dessen Stoffwechselprodukten zeigt. Vor dem Test müssen die Kalibratoren, Kontrollen und Proben in Methanol extrahiert werden. Der Test selbst besteht nur aus einem Inkubationsschritt und arbeitet mit einem doppelten Antikörper-Phasentrennverfahren. Um die Arbeitsschritte zu vereinfachen, werden der erste Antikörper (spezifischer monoklonaler Maus-Antikörper für Cyclosporin A) und der zweite Antikörper (Esel-Anti-Maus-Antikörper) in einem Träger vorgemischt (normales Mausserum), um ein Reagenz, das so genannte Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep, zu erhalten.

Um den Cyclosporin-Spiegel in diesem Kit zu bestimmen, werden zunächst die Vollblutproben, die Kalibratoren und die Kontrollen in Methanol extrahiert. Die Methanolextrakte werden dann mit einem mit Jod-125 markierten Cyclosporin-Tracer und Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep kombiniert. Nach einer Stunde Inkubation werden die Röhrchen zentrifugiert, dekantiert und anschließend ausgezählt. Die Menge der Radioaktivität, die noch in dem Pellet vorhanden ist, verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration des Cyclosporins in der Probe.

4. REAGENZIEN DES KITS

CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (BLAU)	1 Fläschchen/9 mL
CYCLO-Trac SP-Kalibratoren (0–6)	1 Fläschen/2 mL und 5 Fläschen/1 mL
CYCLO-Trac SP ImmunoSep	2 Fläschchen/100 mL
CYCLO-Trac SP-Tracer (ROT)	1 Fläschchen/20 mL
CYCLO-Trac SP-Kontrollen	2 Fläschchen/1 mL
Anzahl der Tests	200

LAGERUNG: Das Kit sollte bei 2–8°C aufbewahrt werden. Nach dem Öffnen jedes Reagenz bei 2–8°C nicht länger als bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blau): gebrauchsfertiges Reagenz
Das Esel-Anti-Maus-Serum/normale Mausserum ist vorgemischt und wird mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung mit 0,08% Natriumazid und einem Netzmittel verdünnt. Es wird blauer Farbstoff zugesetzt. **Unmittelbar vor Verwendung kräftig schütteln.**

4.2 CYCLO-Trac SP-Kalibratoren (0–6): gebrauchsfertiges Reagenz

Cyclosporin-freies Serum enthält 0,01% Natriumazid und ein Netzmittel. Die 6 Cyclosporin-Kalibratoren mit Nennkonzentrationen zwischen 0 und 1200 ng/mL werden in humanem Serum mit 0,1 Natriumazid und einem Netzmittel vorverdünnt. Exakte Konzentrationswerte sind auf den Etiketten und jeder Charge angegeben. Der DiaSorin CYCLO-Trac SP-Kalibrator wurde gemäß dem USP-Cyclosporin-Referenzstandard kalibriert. Ein Vergleich mit anderen Produkten oder Verfahren sollte auf der Grundlage dieses Referenzstandards erfolgen. Die Kalibratoren des Kits sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: gebrauchsfertiges Reagenz
Die Mischung aus monoklonalem Maus-Anti-Cyclosporin-Antikörper und Anti-Maus- bzw. normalem Mausserum wird mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung mit 0,08% Natriumazid und einem Netzmittel vorverdünnt. **Unmittelbar vor Verwendung kräftig schütteln.**

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (rot): gebrauchsfertiges Reagenz
Ein Derivantium des Cyclosporins wird mit Jod-125 markiert und in Zitrat-EDTA-Puffer mit 0,05% Natriumazid, humanem Serum und einem Netzmittel verdünnt. Es wird roter Farbstoff zugesetzt.

4.5 CYCLO-Trac SP-Kontrollen (Spiegel 1 und Spiegel 2) gebrauchsfertiges Reagenz
Das Humanserum wird mit der entsprechenden Menge Cyclosporin A versetzt, um eine Konzentration im vorgeschriebenen Bereich zu erhalten. Die Bereiche für jede Charge sind auf den Kontrollfläschchen in jedem Kit aufgedruckt. Es werden 0,1% Natriumazid und andere Stabilisatoren zugesetzt.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK
Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenziell infektiös zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer von der FDA der USA genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für den Ausschluss des Hepatits-B-Virus (HBV), des Hepatitis-C-Virus (HCV), des Aids-Virus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health: “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”, 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenziell infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

ACHTUNG: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das ggf. mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidbildung zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” des Handbuches “Safety Management” Nr. CDC-22, herausgegeben von den Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 1976.

Gefahrenbezeichnungen der Europäischen Gemeinschaft für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)
R20/21/22 – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Kontakt mit der Haut.
R32 – Entwickelt bei Kontakt mit Säure sehr giftige Gase.
S28 – Bei Kontakt mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 9 µCi (333 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.

5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KIT-REAGENZIEN

6.1 Ungewöhnliche Partikel in einem der Reagenzien

6.2 Verschiebung der Steigung oder Position der Kalibratorkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen

6.3 Abnahme der maximalen Bindung

6.4 Hohe nichtspezifische Bindung

6.5 Schlechte Reproduzierbarkeit bei Duplikaten

7. PROBENENTNAHME UND PROBENVORBEREITUNG

Für die Vollblutextraktion von CYCLO-Trac SP werden 100 mL EDTA-Vollblut benötigt.

HINWEIS: Mit Heparin versetzte Proben dürfen nicht verwendet werden.[19, 27]

ENTNAHME UND LAGERUNG DES VOLLBLUTS

Das Vollblut durch Venenpunktion in einem evakuierten 5- oder 10-mL-Glasröhrchen sammeln. Als Antikoagulationsmittel wird EDTA (7,2 mg/5 mL Blut) verwendet. Zur Aufrechterhaltung der Probenreinheit werden keine weiteren Zusätze oder Konservierungsmittel benötigt. Wird die Probe nicht sofort verwendet, kann sie bei Temperaturen von 2–8°C maximal 7 Tage aufbewahrt werden. Für längere Lagerung (bis 3 Monate) die Proben bei mindestens -20°C einfrieren.[28, 29]

Vollblutproben, die bei 4°C gelagert oder nicht sofort verarbeitet wurden, vor der Entnahme der Proben für den Test mit dem CYCLO-Trac SP Whole Blood-Kit gründlich durchmischen.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

8.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 × 75 mm

8.2 Temperaturgesteuerte Zentrifuge für Röhrchen 12 × 75 mm

8.3 Gammaszintillationszähler zur Zählung von Jod-125

8.4 Schüttelgerät

8.5 Pipettiergeräte:

- **a.** Positive Verdrängungspipetten 400 µL, 100 µL und 50 µL
- **b.** Multipipetten mit Einstellungen zur Abgabe von 1,0 mL und 100 µL

8.6 Methanol (HPLC-geeignet)

8.7 Verschlusskappen für die Blutentnahmeröhrchen (Bestellnummer T1226-32).

9. TESTVERFAHREN

9.1 Jeweils ein Glasröhrchen 12 x 75 mm für Kalibrator, Kontrolle und unbekannte Probe mit Etikett versehen.

9.2 Methanol (HPLC-geeignet) in jedes Röhrchen mit einer positiven Verdrängungs-pipette geben.* Die Röhrchen mit Folie abdecken, wenn die Proben noch nicht hinzugefügt werden können.

9.3 Die Kalibratoren, die Kontrollen und die Vollblutproben mit einer positiven 100-µL-Verdrängungspipette in das Methanol geben.*

HINWEIS: Vorsichtig jede Probe zugeben, dabei mit der Pipettenspitze leicht unter die Methanoloberfläche gehen.

9.4 Sofort nach Zugabe der Probe jedes Röhrchen verschließen und 15 Sekunden lang schütteln.

9.5 Die mit Verschlusskappen versehenen Röhrchen bei 20–25°C 5 Minuten lang mit 1600 G** zentrifugieren.

9.6 Die Methanolextrakte dürfen vor dem Pipettieren in die Teströhrchen nicht verdunsten.

9.7 Die mit Etikett versehenen Probenröhrchen 12 x 75 mm entsprechend dem Testprotokoll (siehe hintere Umschlagseite) vorbereiten

9.8 Die Reagenzien auf Zimmertemperatur (20–25°C) bringen, bevor sie für den Test eingesetzt werden.

9.9 Die Reagenzien wie folgt zugeben:

a. Röhrchen für die Gesamtzählung
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (rot)

b. NSB-Röhrchen
50 µL extrahierter Nullkalibrator
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (rot)
1,0 mL gründlich gemischtes CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blau)

c. CYCLO-Trac SP-Nullkalibrator
50 µL extrahierter CYCLO-Trac SP-Nullkalibrator
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (rot)

d. (A-E)
50 µL extrahierter CYCLO-Trac-Kalibrator
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (rot)

e. Kontrollen und unbekannte Proben
50 µL extrahierte Probe
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (rot)

9.10 Das Fläschchen mit dem Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep kräftig schütteln, sofort 1,0 mL des gut gemischten Reagenz in allen Röhrchen hinzufügen, mit Ausnahme der NSB-Röhrchen und der Röhrchen für die Gesamtzählung.

9.11 Die Röhrchen kräftig schütteln und dann bei 20–25°C eine Stunde lang inkubieren.

9.12 Die Röhrchen 20 Minuten lang bei 20–25°C und 1600 G** zentrifugieren.

* Alternativ können auch 200 µL der Probe in 800 µL Methanol extrahiert werden.

** $G = (1118 \times 10^{-8})$ (Radius in cm) (U/min)^2

9.13 Anschließend sofort den Überstand bei allen Röhrchen mit Ausnahme der Röhrchen für die Gesamtzählung dekantieren, dazu die Röhrchen maximal 2 Minuten lang umdrehen. Die Röhrchen mit Löschpapier abtrocknen, um Tropfen des Überstands zu entfernen, die sich u. U. am Rand befinden, und dann die Röhrchen aufrecht stellen.

9.14 Mit einem Gammaszintillationszähler den Niederschlag in jedem Röhrchen und in den Röhrchen für die Gesamtzählung messen. Dabei ausreichend Zeit einplanen, um eine statistische Genauigkeit zu erreichen (siehe Abschnitt Grenzen des Verfahrens).

10. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

10.1 Im Interesse maximaler Mess- und Wiederholgenauigkeit müssen die Schritte für die Methanolextraktion sorgfältig eingehalten werden. Es müssen positive Verdrängungspipetten (SMI) zur Pipettierung des Methanols und der Proben verwendet werden. Positive Verdrängungspipetten werden außerdem für die Übertragung von 50 µL Methanolextrakt in jedes Teströhrchen benötigt.

10.2 Jedes Aliquot des Reagenz in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.

10.3 Die Einwegröhrchen bestimmter Hersteller können nichtspezifische Bindungen ergeben oder dazu führen, dass das Pellet leicht herausrutscht.

10.4 Die ImmunoSep-Reagenzien müssen unmittelbar vor Verwendung gründlich gemischt werden.

10.5 Liefert eine Probe größere Werte als die höchsten Kalibratorwerte, die Probe erneut extrahieren, dabei mindestens ein Mischungsverhältnis von einem Teil Blut und vier Teilen Methanol einhalten (empfohlen werden Mischungsverhältnisse von 1:9 bis 1:19). Die Testergebnisse mit dem entsprechenden Korrekturfaktor multiplizieren.

10.6 Wenn die Röhrchen nicht innerhalb von 5 Minuten nach der Entnahme aus der Zentrifuge dekantiert werden können, sollten sie neu zentrifugiert werden.

10.7 Unmittelbar nach der Extraktion den Test durchführen.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte mindestens zwei Kontrollproben für jeden Test vorsehen, damit die Gültigkeit der Testergebnisse überprüft werden kann. Wenn Sie ungetestete Kontrollen verwenden und keinen Mittelwert und keine Standardabweichung festgelegt haben, müssen Sie für jede Kontrolle nach mindestens 10 Tests einen Mittelwert und eine Standardabweichung festlegen. Ein zulässiger Wertebereich kann dann für diese Kontrolle mit Standardabweichungen von ±2 der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin hat für die in diesem Kit enthaltenen Kontrollen einen Bereich festgelegt. Diese Bereiche sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt. Die Reagenzien des Kits sollten nicht ausgetauscht werden mit Ausnahme des ^{125}I CYCLO-Trac SP-Tracer.

Für eine komplette Laborkontrolle der konsistenten Leistung bei einem RIA sind zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um eine konsistente Leistung des Kits sicherzustellen.

a. Gesamtzählung

b. Maximale Bindung

Zählungen pro Minute (CPM) des Nullkalibratorröhrchens/CPM-Durchschnittswert der Röhrchen für die Gesamtzählung

c. Nichtspezifische Bindung

CPM des NSB-Röhrchens/CPM-Durchschnittswert der Röhrchen für die Gesamtzählung

d. Steigung der Kalibratorkurve

Beispielsweise sind die Punkte für 80, 50 und 20 % auf der Kalibratorlinie von Durchlauf zu Durchlauf zu überwachen, um die Reproduzierbarkeit sicherzustellen.

12. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Verfahren zur Berechnung der Ergebnisse von RIAs. Bei jedem Verfahren wird eine Kalibrierkurve erstellt, indem die Bindung gegen die Konzentrationen der zur Kalibrierung verwendeten Kalibratoren grafisch dargestellt wird. Die Kurve für den CYCLO-Trac SP-Test erhält man durch grafische Darstellung von % B/B_0 und der logarithmischen Konzentration.

12.1 Den CPM-Durchschnittswert für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede Patientenprobe berechnen.

12.2 Den CPM-Durchschnittswert der NSB-Röhrchen von allen Zählvorgängen subtrahieren, um den korrigierten CPM-Wert zu erhalten.

12.3 Den korrigierten CPM-Wert für jeden Kalibrator, jede Kontrolle oder jede Patientenprobe durch den korrigierten CPM-Wert des Nullkalibrators dividieren.

$$\% \; B/B_0 = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der Patientenprobe – CPT der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators – CPM der NSB}} \times 100$$

12.4 Auf halblogarithmischem Millimeterpapier % B/B_0 der Kalibratoren (y-Achse) und die entsprechenden Konzentrationen (x-Achse) darstellen.

12.5 Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade ziehen.

12.6 Die Cyclosporin-Konzentrationen der Patientenproben von der Kalibratorkurve interpolieren.

In der Praxis verwenden die meisten Labors ein rechnergestütztes Datenreduktions-system. DiaSorin empfiehlt ein Programm zur Anpassung der 4-Parameter-Logistikkurve (4PL) oder der Spline-Kurve.

HINWEIS: KEINESFALLS eine lineare Skala für die Konzentration (x-Achse) und/oder eine logarithmische Skala für B/B_0 s(y-Achse) verwenden.

DATEN NACH DER DATENREDUKTION

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

TABELLE I

DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood-Probendaten

Röhrchen	Doppelter CPM-Wert	Durchschn CPM-Wert	Korrigierter CPM-Wert	Prozent Gebunden (B/T)	Prozent (B/B_0)	Konz. ng/mL)
Gesamtzählung	51.045	50.892				
	50.738					
NSB	1.221	1.328		2,6		
	1.434					
Nullkalibrator	25.323	25.432	24.104	50,0		
	25.541					
Kalibratoren (ng/mL)						
A (20)	22.781	22.806	21.478		89,1	
	22.830					
B (61)	19.850	19.624	18.296		75,9	
	19.397					
C (154)	14.843	14.911	13.583		56,4	
	14.978					
D (379)	9.506	9.570	8.242		34,2	
	9.633					
E (1099)	4.893	4.858	3.530		14,6	
	4.823					
Unbekannte Proben						
1	16.225	16.122	14.794		61,4	126
	16.019					
2	9.764	9.570	8.242		34,2	379
	9.375					

Typische Probendaten und eine Kalibratorkurve sind in TABELLE I und ABBILDUNG 1 dargestellt; sie dienen nur zur Information und dürfen nicht zur Berechnung von Werten verwendet werden.

KALIBRATORKURVE DER CYCLO-Trac® SP WHOLE BLOOD-PROBE

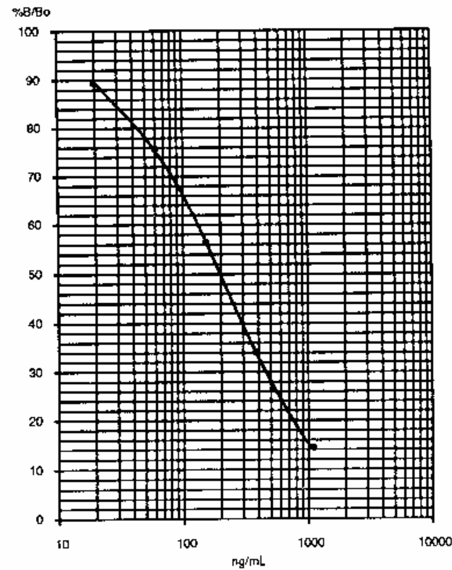


ABBILDUNG 1

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

13.1 Die Proben dürfen nicht mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut werden.

13.2 Die Zählzeiten müssen lang genug sein, um statistische Fehler auszuschließen.

13.3 Monoklonale Antikörper wie OKT3 wurden geprüft und stören den Test nachweislich nicht.

14. ERWARTETE WERTE

Therapeutische Blutspiegel von Cyclosporin bei Patienten mit Nieren-, Herz- und Lebertransplantationen wurden noch nicht umfassend untersucht. Dies ist zum Teil auf die unterschiedlichen Behandlungsprotokolle für die Transplantationen, auf die zur Messung des Cyclosporins verfügbaren Verfahren und auf die gleichzeitige Verabreichung anderer Immunosuppressiva zusammen mit Cyclosporin zurückzuführen.[19, 30, 31]

Eine klinische Untersuchung mit dem CYCLO-Trac SP Whole Blood-Kit wurde in den Universitätskliniken von London (Ontario) und Albany (New York) an Patienten mit Herz-, Nieren- und Lebertransplantationen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurde der temporäre Cyclosporin-Talspiegel im Blut bei transplantierten Patienten gemessen. Die Bluttalwerte wurden 4 bis 90 Tage nach der Transplantation bei Patienten mit Nierentransplantation (n = 10), Herztransplantation (n = 10) und Lebertransplantation (n = 10) in der Universitätsklinik von London (Ontario) kontrolliert. Außerdem wurde eine ähnliche Untersuchung an Patienten mit Nierentransplantation (n = 18) in der Universitätsklinik von Albany (New York) durchgeführt. In Albany wurde der Bluttalspiegel bei transplantierten Patienten nach der Transplantation 199 Tage lang untersucht.

TABELLE II zeigt die durchschnittlichen Cyclosporin-Blutwerte und signifikante Ereignisse (Abstoßung oder Nephrotoxizität) bei transplantierten Patienten in der Universitätsklinik London (Ontario). In diesem Klinikzentrum wurden die Blutspiegelwerte der Patienten auf 400 bis 650 ng/mL Cyclosporin je nach Transplantationsart und klinischem Zustand der Patienten eingestellt.

TABELLE II

Temporäre Cyclosporin-Werte im Vollblut bei Patienten mit Nieren-, Herz- und Lebertransplantationen bei Messung mit dem CYCLO-Trac SP Whole Blood-Kit

Tag nach OP	Niere[a] CyA (ng/mL)				Herz[b] CyA (ng/mL)				Leber[c] CyA (ng/mL)			
	N	Ereign.[d]	MW	SA	N	Ereign.[d]	MW	SA	N	Ereign.[d]	MW	SA
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Ereignisse gesamt		24				13				3		

[a] Cyclosporin: baldige Umstellung von 3,75–5 mg/kg intravenös auf 12 mg/kg in zwei getrennten Dosen; Prednison 2–5 mg/kg mit allmählicher Reduzierung auf 20 mg/Tag; Methylprednisolon 1–2 mg/kg. Bei Nierendysfunktion wurde Cyclosporin abgesetzt und stattdessen OKT3 5 mg/kg über 10 Tage gegeben.

[b] Die Cyclosporin-Gaben begannen am dritten Tag nach der Operation mit 5 mg/kg in zwei getrennten Dosen; Prednison 15 mg/Tag mit allmählicher Reduzierung der Menge; zusätzlich Azathioprin entsprechend Indikation; ALG 50 mg/kg als Einmalgabe, anschließend nur nach Indikation; OKT3 7 Tage lang 5 mg/kg intravenös nach Indikation.

[c] Cyclosporin zuerst intravenös, ab Tag 5 oral, Beginn mit 4 mg/kg und Einstellung entsprechend dem gewünschten Blutspiegel; Prednison 15 mg/Tag, langsam steigern; Azathioprin 2–2,5 mg/kg, langsam absetzen, wenn Anzahl der Thrombozyten abnimmt; Methylprednisolon 500 mg während der OP und 10 Tage lang 15 mg intravenös; OKT3 10 Tage lang 5 mg/kg.

[d] Nephrotoxizität oder Abstoßung

TABELLE III zeigt die durchschnittlichen Cyclosporin-Blutwerte und den entsprechenden Creatinin-Spiegel bei 18 Patienten mit Nierentransplantation der Universitätsklinik Albany (New York).[32] Die Patienten in Albany wurden auf 100–300 ng/mL Cyclosporin-Talspiegel eingestellt.

TABELLE III

Temporäre Cyclosporin-Werte im Vollblut bei 18 Patienten mit Nierentransplantation bei Messung mit dem CYCLO-Trac SP Whole Blood-Kit

	Tag nach[a]	Cyclosporine (ng/mL)			Creatinin-Spiegel (mg/dL)				
Woche	OP	N[b]	MW	SA	N	MW	SA	Min.	Max.
1	0-7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8-14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15-21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22-28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29-35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36-42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43-49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50-56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57-63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64-70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71-77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78-84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85-91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92-98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99-105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106-112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113-119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[a] Patienten wurden mit 2-5 mg/kg Cyclosporin (in Intervallen von 12 Stunden) behandelt; Azathioprin 4 mg/kg vor der OP und allmähliche Reduzierung auf 0,75–1,0 mg/kg; Methylprednisolon als 300-mg-Bolus, anschließend Einstellung auf 20 mg/Tag bis zum 30. Tag nach der Transplantation und 10 mg/Tag bis zum 60. Tag nach der Transplantation.

[b] Individuelle Bestimmung des Cyclosporins

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass der Cyclosporin-Blutspiegel gut auf den gewünschten Wert für jede Transplantationsart eingestellt werden konnte, der vom jeweiligen Klinikzentrum entsprechend dem Transplantationsprotokoll indiziert war.

Da Cyclosporin bei verschiedenen Patienten verschiedene Blutspiegelwerte ergeben kann, müssen bei der Interpretation der Ergebnisse und der Anpassung der Cyclosporin-Dosierung das Datum der Transplantation, weitere verabreichte Medikamente sowie die relevanten klinischen Informationen berücksichtigt werden.

WECHSELWIRKUNG MIT ANDEREN MEDIKAMENTEN

Die folgenden Informationen stammen von Sandoz LTD. in Basel (Schweiz) und betreffen das Medikament Sandimmune® (Cyclosporin):

Cyclosporin wird durch den Stoffwechsel in der Leber schnell abgebaut. Infolgedessen kann der Spiegel im Vollblut durch Medikamente beeinflusst werden, die auf mikrosomale Leberenzyme wirken, insbesondere auf das Zytrochromsystem P-450.

Substanzen, die bekannterweise diese Enzyme hemmen, reduzieren den Leberstoffwechsel und erhöhen den Cyclosporin-Spiegel im Vollblut. Zu den Medikamenten, die nachweislich die Konzentrationen von Cyclosporin im Vollblut erhöhen, gehören Danazol, Ketoconazol, Erythromycin, Nicardipin, Diltiazem, Methyltestosteron sowie orale Kontrazeptiva. Substanzen, welche die Aktivität von Zytochrom P-450 induzieren, intensivieren den Leberstoffwechsel und senken die Cyclosporin-Werte im Vollblut.

Zu den Medikamenten, die nachweislich die Konzentrationen von Cyclosporin im Vollblut senken, gehören Rifampin, Phenytoin, Phenobarbital, Trimethroprim mit Sulfamethoxazol (intravenös verabreicht) und Carbamazepin. Die Überwachung der Blutspiegelwerte von Cyclosporin und die entsprechende Anpassung der Dosierung ist unerlässlich, wenn diese Medikamente zusätzlich verabreicht werden.

Es wurde festgestellt, dass die Prednisolon-Clearance bei Patienten, die mit Cyclosporin behandelt wurden, geringer ist und dass der Cyclosporin-Spiegel im Vollblut entsprechend der Messung mittels RIA nach der Verabreichung von hoch dosiertem Methylprednisolon ansteigt.

15. SPEZIELLE LEISTUNGSMERKMALE

15.1 Präzision

Abweichungen innerhalb eines Tests (Werte = ng/mL)

	Mittelwert	Standardabw.	% VK	N
NIEDRIG	46	4,9	10,7	25
MITTEL	186	6,0	3,2	25
HOCH	625	19,2	3,1	25

Abweichungen zwischen den einzelnen Tests auf Grundlage von Studien mit Vollblutproben in mehreren Klinikzentren

	Mittelwert Cyclosporin (ng/mL)	Standardabw.	% VK	N
Zentrum 1*	91	15,0	16,5	5
	203	27,9	13,7	5
	543	53,7	9,9	5
Zentrum 2	71	6,7	9,5	5
	173	12,9	7,58	5
	466	41,5	8,9	5
Zentrum 3	78	5,4	6,8	5
	195	18,4	9,4	5
	500	50,2	10,0	5
Zentrum 4	87	6,9	7,9	5
	200	13,5	6,8	5
	505	42,5	8,4	5
Zentrum 5	78	3,6	4,6	5
	192	10,2	5,3	5
	497	23,9	4,8	5

* Abweichungen zwischen einzelnen Tests in einem Labor, das erst seit kurzem Radioimmunoassays durchführt.

15.2 EXAKTHEIT: DIE EXAKTHEIT DES TESTS WURDE DURCH EINE LINEARITÄTS- UND EINE WIEDERFINDUNGSPRÜFUNG GETESTET.

Linearität (Parallelität)

Durchschnittliche Wiederfindung bei 30 verschiedenen, seriell verdünnten Patientenproben (Konzentrationsbereich 132-1716 ng/mL)

$$\% \text{ Wiederfindung} = 100 \times \frac{\text{(Verdünnungsfaktor x Wert der verdünnten Probe)}}{\text{(Wert der unverdünnten Probe)}}$$

Verdünnung	1/2	1/4	1/8
% Wiederfindung	96,1	93,3	95,9
Standardabw.	13,7	19,2	22,6
% VK	14,3	20,6	23,6

Genauigkeit

Wiederfindungsstudie: Durchschnittliche Wiederfindung bei 3 Spiegeln zugegebenem Cyclosporin in 5 Proben, jeweils 6 Replikate (n = 30).

	Zugegebenes Cyclosporin (ng/mL)	% Wiederfindung	Standardabw.	% VK
Spiegel 1	95	119	17	14
Spiegel 2	212	109	11	10
Spiegel 2	467	97	7	7

15.3 Analytische Sensitivität (Nachweisgrenzen)

Die durchschnittliche Sensivität des CYCLO-Trac SP Whole Blood-Tests beträgt 8,7 ng/mL (n = 20), wenn sie als die anscheinende Konzentration bei 3 Standardabweichungen von den Zählungen bei maximaler Bindung definiert wird.

15.4 Analytische Spezifität

Durchschnittliche Kreuzreaktivität der Cyclosporin-Metabolite im CYCLO-Trac SP Whole Blood-Test. Die Kreuzreaktivität wird wie folgt definiert:

$$100 \times \frac{\text{(Cyclosporin-Konzentration bei 50 \% } B/B_0\text{)}}{\text{(Metabolitkonzentration bei 50 \% } B/B_0\text{)}}$$

Cyclosporin-Metabolit	% Kreuzreaktivität
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Interferenz

Die folgenden Substanzen wurden in Aliquots einer Vollblutprobensammlung mit Cyclosporin (160–250 ng/mL) versetzt. Keine dieser Substanzen störte die Cyclosporin-Messung in den im Folgenden angegebenen Konzentrationen.

Substanz	**Konzentration**
Cholesterol	100–1000 mg/dL
Triglyceride	300–1000 mg/dL
Bilirubin	5–30 mg/dL
Azathioprin	50–200 ng/mL
Cimetidin	500–1000 ng/mL
Nifedipin	100–200 ng/mL
6-Methylprednisolon	20–60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

Die folgende Liste gleichzeitig verabreichter Medikamente wurde mit Konzentrationen bis zu 100 µg/mL getestet und störten den Test nachweislich nicht:

Acetaminophen	Lidocain
N-Acetyl-Procainamid	Metoclopramid
Cephalosporin	Naficillin
Chloramphenicol	Penicillin
Digoxin	Propranolol
Disopyramid	Rifampin
Ethosuximid	Salicylsäure
Gentamicinsulfat	Tobramycin
Kanamycin	Verapamil

Vergleich des CYCLO-Trac SP Whole Blood-Tests von DiaSorin mit HPLC

Studie	Transplanta-tionsart	Geradengleichung	Regressions-koeffizient	n
Pharmakokinetisch	entfällt	y = 0,9121x + 47	r = 0,9719	373
University of Pennsylvania	Niere	y = 0,8022x + 34	r = 0,9585	82
	Herz	y = 0,9196x + 50	r = 0,9223	42
	Leber	y = 0,9572x + 48	r = 0,9067	40
Albany Medical Center	Niere	y = 1,038x + 27	r = 0,9124	187
University of Western Ontario	Niere	y = 1,3074x + 29	r = 0,9703	73
	Herz	y = 1,4672x + 16	r = 0,9696	75
	Leber	y = 1,3575x - 12	r = 0,9067	63

Die angegebenen Korrelationsdaten sind die Ergebnisse von Studien in verschiedenen Labors, die von Dritten geprüfte HPLC-Verfahren verwendeten. Es sollte kein Vergleich mit diesen Daten vorgenommen werden, und bevor Verfahren verglichen werden, müssen diese sorgfältig standardisiert werden.

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

EQUIPO ^{125}I RIA CYCLO-TRAC® SP PARA SANGRE COMPLETA

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

El equipo de ensayo radioinmunológico (RIA) CYCLO-Trac® SP en sangre completa tiene como finalidad la determinación cuantitativa de ciclosporina (Ciclosporina A, Ciclosporina, Sandimmune®) en sangre completa como ayuda en el tratamiento de pacientes con transplantes de corazón, riñón e hígado que reciben ciclosporina.

PRECAUCIÓN: LA LEGISLACIÓN ESTADOUNIDENSE RESTRINGE LA VENTA Y DISTRIBUCIÓN DE ESTE DISPOSITIVO A MÉDICOS O LABORATORIOS CLÍNICOS O POR ORDEN DE ÉSTOS; Y SU UTILIZACIÓN SE RESTRINGE A MÉDICOS O POR ORDEN DE ÉSTOS. EL EQUIPO RIA CYCLO-TRAC SP SOLO DEBE UTILIZARSE CON CICLOSPORINA.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La ciclosporina (Ciclosporina A, Ciclosporina, Ciclosporina, Sandimmune) es un péptido cíclico de once aminoácidos de origen fúngico con potentes propiedades inmuno-depresoras.[1, 2] Aunque su mecanismo de acción se encuentra aún bajo investigación, la ciclosporina parece afectar al metabolismo de los linfocitos T cooperadores y a los linfocitos T supresores, que afecta al sistema inmunitario.[3-5]

Si bien esta droga ha demostrado gran utilidad para evitar el rechazo en los transplantes de órganos,[6-9] se ha registrado una serie de efectos adversos,[10,11] los más serios de los cuales consisten en nefrotoxicidad y hepatoxicidad asociadas con altos niveles en sangre de este medicamento[12-16] . Por otra parte, la absorción y el metabolismo de la ciclosporina es muy variable de un paciente a otro.[17-19] Por ello, es preciso individualizar y supervisar la dosificación para lograr una óptima inmuno-supresión y minimizar los efectos adversos.[18,19] Casi toda la ciclosporina presente en la sangre completa está unida a glóbulos rojos y proteínas plasmáticas.[20-22] Esta distribución se ve afectada por los cambios de temperatura y del hematocrito.[21, 22] Para garantizar resultados coherentes es necesario un protocolo estándar para la recogida de sangre.[19]

En la actualidad existen dos métodos disponibles para supervisar los niveles de ciclosporina en los pacientes: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y ensayo radioinmunológico (RIA). Los ensayos RIA de primera generación utilizaban anticuerpos policlonales que mostraron alta reactividad cruzada con metabolitos circulantes.[23] Los valores de ciclosporina generados en estos ensayos eran siempre superiores a los generados mediante HPLC.[24] Los ensayos RIA de segunda generación se basan en tecnología de anticuerpos monoclonales.[25] Se han desarrollado anticuerpos mono-clonales específicos y no específicos. El anticuerpo específico mide únicamente el precursor de la ciclosporina y genera valores similares a los obtenidos mediante HPLC. El anticuerpo no específico mide el precursor y los metabolitos y genera resultados similares a los de los ensayos RIA de primera generación.[26]

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo RIA CYCLO-Trac SP para sangre completa de DiaSorin utiliza anticuerpo monoclonal específico que mide solo ciclosporina y no parece tener reactividad cruzada significativa con sus metabolitos. Antes del ensayo, es preciso realizar una extracción con metanol para los calibradores, los controles y las muestras. El ensayo propiamente dicho consiste en un solo paso de incubación y utiliza una técnica de separación de fase de doble anticuerpo. Para simplificar el procedimiento, el primer anticuerpo (monoclonal de ratón específico para Ciclosporina A), y el segundo (de burro antirratón) se mezclan previamente con un portador (suero normal de ratón) para producir un solo reactivo denominado Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

Para determinar los niveles de ciclosporina con este equipo, las muestras de sangre completa, los calibradores y los controles se extraen previamente con metanol. A continuación, los extractos con metanol se combinan con trazador de ciclosporina etiquetado con yodo-125 y Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Tras 1 hora de incubación los tubos se centrifugan, se decantan y, a continuación, se cuentan. La cantidad de radioactividad remanente en la pastilla es inversamente proporcional a la concentración de ciclosporina encontrada en la muestra.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

NSB CYCLO-Trac SP ImmunoSep (AZUL)	1 vial/9 mL
Calibradores (0-6) CYCLO-Trac SP	1 vial/2 mL, 5 viales/1 mL
CYCLO-Trac SP ImmunoSep	2 viales/100 mL
Trazador CYCLO-Trac SP (ROJO)	1 vial/20 mL
Controles CYCLO-Trac SP	2 viales/1 mL
Número de pruebas	200

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8°C. Una vez abiertos, almacene los reactivos a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento que figura en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de vencimiento del trazador.

No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (azul): reactivo listo para utilizar
La mezcla previa de suero de burro antirratón/suero normal de ratón se diluye en solución salina tampón fosfato que contiene azida sódica al 0,08% y un tensioactivo. Se añade tintura azul. **Agite con vigor inmediatamente antes de utilizarlo.**

4.2 Calibradores (0-6) CYCLO-Trac SP: reactivos listo para utilizar
El suero sin ciclosporina contiene azida sódica al 0,1% y un tensioactivo. Seis calibradores de ciclosporina a concentraciones nominales entre 0 y 1200 ng/mL, previamente diluidos en suero humano que contiene azida sódica al 0,1% y tensioactivo. Se asignan valores de concentración exactos de acuerdo con cada lote y se indican en las etiquetas de los viales. El calibrador CYCLO-Trac SP de DiaSorin se ha calibrado frente el estándar de referencia par ciclosporina de la USP. Las comparaciones con otros productos o procedimientos deben realizarse con este estándar de referencia. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico in vitro.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: reactivo listo para utilizar
La mezcla previa de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ciclosporina y de burro antirratón / suero normal de ratón se diluye en solución salina tampón fosfato que contiene azida sódica al 0,08% y un tensioactivo. **Agite con vigor inmediatamente antes de utilizarlo**.

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (rojo): reactivo listo para utilizar
Un derivado de la ciclosporina se etiqueta con yodo-125 y se diluye con tampón EDTA citrato que contiene azida sódica al 0,05%, suero humano y un tensioactivo. Se añade tintura roja.

4.5 Controles CYCLO-Trac SP (nivel 1 y nivel 2): reactivo listo para utilizar
Suero humano con la cantidad apropiada de ciclosporina A para obtener una concentración que se encuentre dentro del rango especificado. Los rangos para cada lote están impresos en los viales de los controles incluidos en cada equipo. Se añade azida sódica al 0,1% y otros estabilizadores.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO
No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátese como potencialmente infeccioso.

Todas las unidades de donantes de suero/plasma se han probado en conformidad con un método aprobado por la FDA estadounidense y han dado resultados negativos para la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no garantizan que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª edición, mayo de 1999 o actual, de Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," en el manual Guide-Safety Management Nº CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)
R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.
S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO-125

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 9 µCi (333 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.

5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS DEL EQUIPO

6.1 Presencia de partículas anómalas en alguno de los reactivos.

6.2 Desviación en la pendiente o posición de la curva del calibrador con respecto al resultado habitual.

6.3 Disminución de la unión máxima.

6.4 Alto nivel de uniones no específicas.

6.5 Reproductividad pobre entre duplicados.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para el procedimiento de extracción de sangre completa del CYCLO-Trac SP se precisan cien microlitros de sangre completa con EDTA.

NOTA: No deben utilizarse muestras heparinizadas.[19, 27]

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE SANGRE COMPLETA

Recoja la sangre por punción venosa en un tuvo de vidrio vacío de 5 ó 10 mL. Debe utilizarse EDTA (7,2 mg/5 mL de sangre) como anticoagulante. No se precisa ningún otro aditivo ni conservante para mantener la integridad de la muestra. Si no se utilizan las muestras de inmediato, almacénelas a 2-8°C o menos durante un máximo de 7 días. Si desea almacenarlas durante más tiempo (hasta 3 meses) congélelas a -20°C o menos.[28, 29]

Las muestras de sangre almacenadas a 4°C, o que no se han procesado de inmediato, deben mezclarse bien antes de tomar muestras para analizar en el equipo de sangre completa CYCLO-Trac SP.

8. EQUIPO Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

8.1 Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.

8.2 Centrífuga controlada por temperatura con capacidad para 12 tubos de 75 mm.

8.3 Contador de centelleo de rayos gamma capaz de contar yodo-125.

8.4 Mezclador vórtex.

8.5 Utensilios de dosificación.

- **a.** Pipetas de desplazamiento positivo de 400 µL, 100 µL y 50 µL.
- **b.** Dispensadores repetitivos calibrados para suministrar 1,0 mL y 100 µL.

8.6 Metanol (grado HPLC).

8.7 Tapones para tubos de extracción (Scientific Products Nº T1226-32).

9. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

9.1 Etiquete un tubo de ensayo de vidrio de 12 x 75 para cada calibrador, control y muestra desconocida.

9.2 Suministre 400 µL de metanol (grado HPLC) a cada tubo con una pipeta de desplazamiento positivo.* Cubra los tubos con parafilm si las muestras no están listas par añadirlas.

9.3 Añada los calibradores, los controles y las muestras de sangre completa al metanol con una pipeta de desplazamiento positivo de 100 µL.*

NOTA: Suministre lentamente cada muestra con la punta de la pipeta colocada un poco por debajo de la superficie del metanol.

9.4 Inmediatamente tras la adición de la muestra tape cada tubo y mezcle en vórtex durante 15 segundos.

9.5 Centrifugue los tubos tapados a 1600 x g** y 20-25°C durante 5 minutos.

9.6 Tenga cuidado para que los extractos de metanol no se evaporen antes de dosificarlos en los tubos de ensayo.

9.7 Prepare y etiquete 12 tubos de ensayo de 75 mm de acuerdo con el protocolo Esquema del ensayo (contraportada).

9.8 Deje que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarlos en el ensayo.

9.9 Añada los reactivos de este modo:

a. Tubos de cuentas totales
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rojo)

b. Tubos de unión no específica (NSB)
50 µL de calibrador 0 extraído
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rojo)
1,0 mL de CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (azul) bien mezclado

c. Calibrador 0 para CYCLO-Trac SP
50 µL de Calibrador 0 CYCLO-Trac SP extraído
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rojo)

d. Calibradores (A-E) CYCLO-Trac SP
50 µL de calibrador CYCLO-Trac extraído
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rojo)

e. Control y muestras desconocidas
50 µL de muestra extraída
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (rojo)

9.10 Agite con vigor el frasco de Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep; inmediatamente añada 1,0 mL de reactivo bien mezclado a todos los tubos salvo los de cuentas totales y los tubos NSB.

9.11 Agite en vórtex con vigor e incúbelos durante 1 hora a 20-25°C.

9.12 Centrifugue los tubos a 1600 x g** durante 20 minutos a 20-25°C.

9.13 Decante inmediatamente los sobrenadantes de todos los tubos salvo los de cuentas totales invirtiéndolos durante un máximo de 2 minutos. Seque los tubos sobre papel absorbente para eliminar posibles gotas de sobrenadante que puedan quedar en los bordes antes de colocar los tubos hacia arriba.

* Como alternativa pueden extraerse 200 µL de muestra con 800 µL de metanol.

** $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radio en cm) $(rpm)^2$

9.14 Utilice un contador de centelleo de rayos gamma para contar el precipitado de cada tubo y los tubos de cuentas totales a fin de conseguir precisión estadística (vea la sección Limitaciones del procedimiento).

10. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

10.1 Con el fin de obtener la máxima exactitud y precisión, las extracciones con metanol deben realizarse con cuidado; deben utilizarse pipetas de desplazamiento positivo (SMI) para suministrar tanto el metanol como las muestras. También se precisan estas pipetas para transferir 50 µL de extracto de metanol a cada tubo de ensayo.

10.2 Añada cada alícuota de reactivo al tercio inferior del tubo de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.

10.3 Los tubos desechables de algunos fabricantes pueden generar numerosas uniones no específicas u ocasionar una mayor diferencia en la pastilla.

10.4 Los reactivos ImmunoSep deben mezclarse con vigor inmediatamente antes de utilizarlos.

10.5 Si la lectura de una muestra es mayor que el calibrador más alto vuelva a extraer la muestra con una proporción de sangre: metanol mayor de 1:4 (se recomienda 1:9 o 1:19). Multiplique los resultados del ensayo por el factor de corrección apropiado.

10.6 Si no es posible decantar los tubos en 5 minutos tras la detención de la centrífuga se recomienda centrifugar los tubos de nuevo.

10.7 Realice el ensayo inmediatamente después del paso de extracción.

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos muestras de control en cada ensayo para asegurar la validez de los resultados de cada ensayo. Si utiliza controles aún no sometidos a ensayo y no ha determinado una desviación media y estándar, debe hacerse esto para cada control usando un mínimo de diez ensayos. Entonces se puede obtener un rango aceptable de valores para estos controles usando desviaciones estándar de ±2 de los valores previamente determinados. El laboratorio de control de calidad de DiaSorin ha determinado un rango para los controles que se incluyen en este equipo. Estos rangos están impresos en los viales de los controles. Se recomienda no intercambiar los reactivos del equipo salvo el trazador ^{125}I CYCLO-Trac SP.

Para que un laboratorio pueda supervisar el desempeño uniforme de un ensayo RIA hay factores adicionales que deben comprobarse. DiaSorin recomienda comprobar periódicamente los siguientes parámetros para asegurar el desempeño uniforme del equipo.

a. Cuentas totales

b. Unión máxima

Cuentas por minuto (CPM) de tubo de calibrador 0/Media de CPM de tubos de cuentas totales.

c. Unión no específica

CPM de tubo NSB /Media de CPM de tubos de cuentas totales.

d. Pendiente de la curva del calibrador

Por ejemplo, controle la capacidad de reproducción de ciclo a ciclo en los puntos de 80, 50 y 20% de la línea del calibrador.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibrado que relacione el alcance de la unión con las concentraciones de los calibradores de calibrado. La curva para el ensayo de CYCLO-Trac SP se obtiene trazando % B/B_0 frente a concentración logarítmica.

12.1 Calcule el promedio de CPM de cada calibrador, control y muestra del paciente.

12.2 Reste el promedio de CPM de los tubos de NSB a todas las cuentas promedio para obtener la CPM corregida.

12.3 Divida las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra de paciente por la CPM corregida del calibrador 0.

$$\% \ B/B_0 = \frac{\text{CPM de calibrador o muestra de paciente - CPT de NSB}}{\text{CPM de calibrador 0 - CPM de NSB}} \times 100$$

12.4 Con un papel gráfico semilog, trace el porcentaje B/B_0 de los calibradores (eje Y) frente a su correspondiente concentración (eje X).

12.5 Una los puntos con una línea de ajuste óptimo.

12.6 Interpole las concentraciones de ciclosporina de las muestras del paciente a partir de la curva de calibrador.

En la práctica, la mayoría de laboratorios utilizan un sistema informático de reducción de datos. DiaSorin recomienda la utilización de un programa de ajuste de línea estriada o una línea logística de 4 parámetros.

NOTA: NO utilice una escala de concentración lineal (eje X) ni una escala logarítmica B/B_0 (eje Y).

DATOS DE REDUCCIÓN

El laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza un ajuste de línea estriada alisada.

TABLA I

Datos de muestra de sangre completa con CYCLO-Trac SP de DiaSorin

Tubo	CPM duplicado	Promedio CPM	CPM corregido	Unión porcentual (B/T)	Porcentaje (B/B_0)	Conc. (ng/mL)
Cuentas totales	51.045	50.892				
	50.738					
NSB	1.221	1.328		2,6		
	1.434					
Calibrador 0	25.323	25.432	24.104	50,0		
	25.541					
Calibradores (ng/mL)						
A (20)	22.781	22.806	21.478		89,1	
	22.830					
B (61)	19.850	19.624	18.296		75,9	
	19.397					
C (154)	14.843	14.911	13.583		56,4	
	14.978					
D (379)	9.506	9.570	8.242		34,2	
	9.633					
E (1099)	4.893	4.858	3.530		14,6	
	4.823					
Muestras desconocidas						
1	16.225	16.122	14.794		61,4	126
	16.019					
2	9.764	9.570	8.242		34,2	379
	9.375					

La TABLA I y la FIGURA 1 ofrecen ejemplos de datos típicos de muestras y de una curva de calibrado; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

Curva de calibrador de muestras de sangre completa de CYCLO-Trac® SP

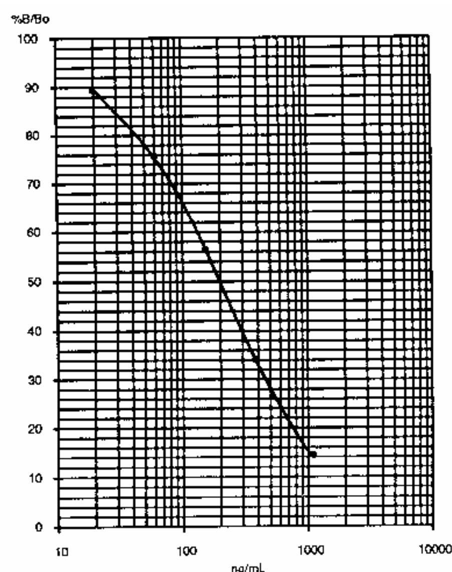


FIGURA 1

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

13.1 Las muestras no deben congelarse y descongelarse de forma reiterada.

13.2 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores estadísticos.

13.3 Los anticuerpos monoclonales como el OKT3 se han evaluado y han demostrado no interferir en el ensayo.

14. VALORES PREVISTOS

Los niveles de sangre terapéuticos para ciclosporina en pacientes sometidos a transplante de riñón, corazón e hígado no están bien establecidos. En parte, esto es debido a los diversos protocolos de tratamiento practicados para transplantes, los métodos disponibles para la medición de ciclosporina y la administración concomitante de otros medicamentos inmunosupresores con ciclosporina.[19, 30, 31]

En los Hospitales Universitarios de Londres, Ontario y Albany, Nueva York, se realizó una evaluación clínica utilizando el equipo de sangre completa CYCLO-Trac SP en pacientes con transplantes de riñón, corazón e hígado. Estas evaluaciones midieron los niveles de caída temporal de ciclosporina en sangre en pacientes con transplantes. Los valores de caída de sangre se observaron tras el transplante desde 4 días hasta 90 días en pacientes con transplantes de riñón (n = 10), corazón (n = 10) e hígado (n = 10) en el Hospital Universitario de Londres, Ontario. Asimismo, se realizó una evaluación similar con pacientes de transplantes de riñón (n = 18) en el Hospital Universitario en Albany, Nueva York. En Albany, los niveles de caída de sangre se observaron desde el transplante hasta 199 días tras la operación.

La TABLA II muestra los valores medios de ciclosporina en sangre y los hechos significativos (rechazo o nefrotoxicidad) observados en pacientes de transplantes en el Hospital Universitario de Londres, Ontario. En este centro, los niveles de sangre de los pacientes se mantuvieron con 400 a 650 ng/mL de ciclosporina en función del tipo de transplante y las condiciones clínicas de los pacientes.

TABLA II

Valores temporales de ciclosporina en sangre completa en pacientes con transplantes de riñón, corazón e hígado medido con el equipo de sangre completa CYCLO-Trac SP.

Día tras operación	Riñón[a] M Ci (ng/mL)				Corazón[b] M Ci (ng/mL)				Hígado[c] M Ci (ng/mL))			
	N	Incid.	[d]Media	S.D.	N	Incid.	[d]Media	S.D.	N	Incid.	[d]Media	S.D.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Total de incidencias		24				13				3		

[a] Ciclosporina: 3,75 mg/kg a 5 mg/kg I.V. tendiendo a 12 mg/kg en dos dosis separadas tan pronto como sea posible, prednisona 2-5 mg/kg reduciendo hasta 20 mg/día, metilpredniso-lona 1-2 mg/kg. Si no había función del riñón, se interrumpió la ciclosporina y se suministró OKT3 5 mg/kg durante 10 días.

[b] Se comenzó con la ciclosporina el tercer día tras la operación, 5 mg/kg en dos dosis separadas, prednisona, 15 mg al día reduciendo de forma gradual, también azatioprina según las indicaciones, ALG 50 mg/kg suministrado una vez y continuado solo según las indicaciones, OKT3 5 mg/kg I.V. durante 7 según las indicaciones.

[c] Ciclosporina suministrada I.V. al comienzo con dosis oral comenzando el quinto día a 4 mg/kg y mantenida en el nivel de sangre deseado, prednisona 15 mg diarios disminuyendo de forma gradual, azatioprina 2-2,5 mg/kg e interrumpida cuando las plaquetas comienzan a disminuir, metilprednisolona 500 mg de forma intraoperativa y 15 mg I.V. durante 10 días, OKT3 5 mg/kg durante 10 días.

[d] Nefrotoxicidad o rechazo.

La TABLA III muestra los valores medios de ciclosporina en sangre y los correspondientes niveles de creatinina en 18 pacientes de transplante de riñón en el Hospital Universitario de Albany, Nueva York.[32] En Albany, los pacientes se mantuvieron a un nivel de ciclosporina entre 100 y 300 ng/mL.

TABLA III

Valores temporales de ciclosporina en sangre completa en 18 pacientes de transplante de riñón medidos mediante el equipo de sangre completa CYCLO-Trac SP.

	Día tras[a]	Ciclosporina (ng/mL)			Niveles de creatinina (mg/dL)				
Semana	operación	N[b]	Media	S.D.	N	Media	S.D.	MÍN	MÁX
1	0-7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8-14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15-21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22-28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29-35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36-42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43-49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50-56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57-63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64-70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71-77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78-84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85-91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92-98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99-105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106-112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113-119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[a] Los pacientes tratados con ciclosporina 2-5 mg/kg (en intervalos de doce horas), azatioprina 4 mg/kg antes de la operación disminuyendo hasta 0,75 a 1,0 mg/kg, y metilprednisolona suministrada como una píldora de 300 mg y ajustada después a 20 mg/día durante 30 días tras el transplante y 10 mg/día durante 60 tras el transplante.

[b] Determinaciones individuales de ciclosporina.

Los resultados de estos estudios demuestran que los niveles de ciclosporina en sangre se mantuvieron en los niveles de sangre deseados para cada tipo de transplante como se indicaba en los protocolos de transplante utilizados en cada centro.

Dado que la ciclosporina puede producir distintos niveles en sangre en diferentes pacientes, la interpretación de los resultados y el ajuste de la dosis de ciclosporina debe considerar también el periodo posterior al transplante, otros medicamentes administrados e información clínica importante relativa al paciente.

INTERACCIONES DE LAS DROGAS

Sandoz LTD. de Basilea, Suiza, informa de lo siguiente acerca del medicamento Sandimmune[(r)] (ciclosporina):

La ciclosporina se metaboliza de forma extensiva en el hígado. Por ello, su nivel en sangre completa puede verse influido por drogas que afectan a los enzimas microsomales, en particular el sistema citocromo P-450.

Las sustancias conocidas por inhibir dichos enzimas disminuirán el metabolismo hepático e incrementarán los niveles de ciclosporina en sangre completa. Las drogas identificadas por su capacidad de incrementar la concentración de ciclosporina en sangre completa incluyen danazol, ketoconazole, eritromicina, nicardipine, diltiazem, metiltestosterona y anticonceptivos orales. Las sustancias inductoras de la actividad de citocromo P-450 incrementarán el metabolismo hepático y harán disminuir los niveles de ciclosporina en sangre completa.

Las drogas identificadas por reducir la concentración de ciclosporina en sangre completa incluyen rifampin, fenitoína, fenobarbital, trimetoprim I.V. con sulfametoxazol y carb-amazepina. El control de los niveles de ciclosporina en sangre y el ajuste de la dosis apropiada son esenciales cuando se utilizan estas drogas de forma simultánea.

Se ha descubierto que la eliminación de prednisolona se reduce en pacientes tratados con ciclosporina y que los niveles de ciclosporina en sangre completa, medidos con el equipo RIA, se incrementan tras la administración de altas dosis de metilprednisolona.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ESPECÍFICAS

15.1 Precisión

Variación intraensayo (valores = ng/mL)

	Valor de la media	S.D.	(% C.V.)	N
BAJA	46	4,9	10,7	25
MEDIA	186	6,0	3,2	25
ALTA	625	19,2	3,1	25

La variación entre ensayos es el resultado de estudios de competencia de varios centros utilizando muestras de sangre completa.

	Media de ciclosporina (ng/mL)	S.D.	(% C.V.)	N
Centro 1*	91	15,0	16,5	5
	203	27,9	13,7	5
	543	53,7	9,9	5
Centro 2	71	6,7	9,5	5
	173	12,9	7,58	5
	466	41,5	8,9	5
Centro 3	78	5,4	6,8	5
	195	18,4	9,4	5
	500	50,2	10,0	5
Centro 4	87	6,9	7,9	5
	200	13,5	6,8	5
	505	42,5	8,4	5
Centro 5	78	3,6	4,6	5
	192	10,2	5,3	5
	497	23,9	4,8	5

* Indica la variación entre ensayos detectada en un laboratorio que comienza a realizar ensayos radioinmunológicos.

15.2 VERACIDAD: LA VERACIDAD DEL ENSAYO SE COMPROBÓ CON LAS PRUEBAS DE LINEALIDAD Y RECUPERACIÓN.

Linealidad (paralelismo)

Recuperación media para 30 muestras diferentes de pacientes diluidas en serie (rango de concentración 132-1716 ng/mL).

$$\% \text{ recuperación} = 100 \times \frac{(\text{factor de dilución x valor de muestra diluida})}{(\text{valor de la muestra sin diluir})}$$

Dilución	1/2	1/4	1/8
% recuperación	96,1	93,3	95,9
S.D.	13,7	19,2	22,6
(% C.V.)	14,3	20,6	23,6

Exactitud

Estudio de recuperación: Promedio de recuperación a 3 niveles de ciclosporina añadida para 5 muestras, 6 réplicas de cada una (n=30).

	Ciclosporina añadida (ng/mL)	% recuperación	S.D.	(% C.V.)
Nivel 1	95	119	17	14
Nivel 2	212	109	11	10
Nivel 3	467	97	7	7

15.3 Sensibilidad analítica (límites de detección)

Cuando se la define como la concentración evidente en tres desviaciones estándar de las cuentas con una unión máxima, la sensibilidad media del ensayo en sangre completa CYCLO-Trac SP es de 8,7 ng/mL (n=20).

15.4 Especificidad analítica

Promedio de reactividad cruzada de metabolitos de ciclosporina en el ensayo en sangre completa CYCLO-Trac SP. La reactividad cruzada se define como:

$$100 \times \frac{(\text{Concentración de ciclosporina a 50\% } B/B_0)}{(\text{Concentración de metabolitos a 50\% } B/B_0)}$$

Metabolitos de ciclosporina	**% Reactividad cruzada**
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Interferencia

Las sustancias siguientes se añadieron a alícuotas de mezclas de sangre completa que contenían ciclosporina (160-250 ng/mL). Ninguna de ellas interfirió en las medidas de ciclosporina en las concentraciones indicadas a continuación.

Sustancia	**Concentración**
Colesterol	100-1000 mg/dL
Triglicéridos	300-1000 mg/dL
Bilirrubina	5-30 mg/dL
Azatioprina	50-200 ng/mL
Cimetidina	500-1000 ng/mL
Nifedipina	100-200 ng/mL
6-metil-prednisolona	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

La siguiente lista de drogas administradas de forma simultánea ha sido probada a niveles de hasta 100 µg/mL y se ha demostrado que no interfieren con el ensayo:

Acetaminofen	Lidocaina
N-Acetilprocainamida	Metoclopramida
Cefalosporina	Naficilina
Cloramfenicol	Penicilina
Digoxina	Propranolol
Disopiramida	Rifampin
Etosuximida	Ácido salicílico
Gentamicina sulfato	Tobramicina
Kanamicina	Verapamil

Comparación entre el ensayo en sangre completa CYCLO-Trac SP de DiaSorin y HPLC

Estudio	Tipo de transplante	Ecuación lineal	Coeficiente de regresión	n
Farmacocinético	N/A	Y = 0,9121X + 47	r = 0,9719	373
Universidad de Pensilvania	Riñón	Y = 0,8022X + 34	r = 0,9585	82
	Corazón	Y = 0,9196X + 50	r = 0,9223	42
	Hígado	Y = 0,9572X + 48	r = 0,9067	40
Centro médico de Albany	Riñón	Y = 1,038X + 27	r = 0,9124	187
Universidad de Western Ontario	Riñón	Y = 1,3074X + 29	r = 0,9703	73
	Corazón	Y = 1,4672X + 16	r = 0,9696	75
	Hígado	Y = 1,3575X - 12	r = 0,9067	63

La correlación de los datos presentados representa los resultados de los estudios realizados en una serie de laboratorios con procedimientos HPLC validados de forma independiente. No deben realizarse comparaciones con estos datos y toda comparación de métodos debe realizarse tras un cuidadoso proceso de estandarización de los métodos.

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

KIT ^{125}I RIA CYCLO-TRAC® SP-SANGUE INTERO

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Il kit per l'analisi radioimmunologica CYCLO-Trac® SP Sangue Intero (RIA) serve per la determinazione quantitativa di ciclosporina (Ciclosporina A, Ciclosporina, Sandimmune(r)) nel sangue intero quando sono necessarie indicazioni nella scelta terapeutica di pazienti che hanno subito trapianto di cuore, reni e fegato e assumono ciclosporina.

AVVERTENZA: LA LEGGE FEDERALE STATUNITENSE LIMITA LA VENDITA E LA DISTRIBUZIONE DI QUESTO APPARECCHIO A, O DIETRO PRESCRIZIONE DI, UN MEDICO O AD UN LABORATORIO CLINICO; IL SUO USO E' LIMITATO A, O SU ORDINE DI, UN MEDICO. IL KIT RIA CYCLO-TRAC SP DEVE ESSERE UTILIZZATO SOLO CON CICLOSPORINA.

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La ciclosporina (Ciclosporina A, Ciclosporina, Sandimmune) è un undecapeptide ciclico di origine fungina con potenti proprietà immunosoppressive.[1,2] Anche se si sta ancora studiando il suo meccanismo di azione, la ciclosporina sembra influire sul metabolismo sia dei linfociti T-helper sia dei linfociti T-soppressore, che indeboliscono il sistema immunitario.[3-5]

Sebbene questo farmaco abbia dimostrato la sua capacità di prevenire il rigetto nei trapianti di nuovi organi,[6-9] sono stati riferiti vari effetti indesiderati,[10,11] i più gravi dei quali sono nefrotossicità ed epato-tossicità associati ad elevati livelli nel sangue di questo farmaco.[12-16] Inoltre, l'assorbimento e il metabolismo della ciclosporina è altamente variabile da paziente a paziente.[17-19] Pertanto, è necessario individualizzare e monitorare i dosaggi al fine di ottenere un immunosoppressione ottimale e ridurre gli effetti collaterali indesiderati.[18,19] Quasi tutta la ciclosporina presente nel sangue intero è legata ai globuli rossi e alle proteine plasmatiche.[20-22] Questa distribuzione è determinata dalle variazioni di temperatura e dall'ematocrito.[21,22] Per assicurare risultati costanti, è necessario stabilire un protocollo standardizzato per il prelievo del sangue.[19]

Attualmente sono disponibili due metodi per monitorare i livelli di ciclosporina nei pazienti: cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) ed analisi radioimmunologica (RIA). Il metodo RIA di prima generazione utilizzava anticorpi policlonali i quali presentavano elevata reattività incrociata con i metaboliti in circolazione.[23] I valori della ciclosporina ottenuti da questi metodi RIA invariabilmente superavano quelli ottenuti mediante HPLC.[24] Il metodo RIA di seconda generazione si basa su una tecnologia di anticorpo monoclonale.[25] Sono stati sviluppati anticorpi monoclonali sia specifici sia non specifici. L'anticorpo specifico misura solo il composto parente della ciclosporina e dà valori simili a quelli ottenuti con HPLC. L'anticorpo non specifico misura sia il composto parente sia i metaboliti e dà risultati simili a quelli dei metodi RIA di prima generazione.[26]

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

Il kit RIA DiaSorin CYCLO-Trac SP Sangue intero impiega un anticorpo monoclonale specifico che misura solo la ciclosporina e non presenta alcuna reattività incrociata significativa con i suoi metaboliti. Per i calibratori, i controlli e i campioni è richiesta una fase di estrazione con metanolo prima dell'analisi. L'analisi stessa consiste di un'unica fase di incubazione e utilizza una tecnica di separazione di fase con doppio anticorpo. Per semplificare la procedura, il primo anticorpo (monoclonale del topo specifico per Ciclosporina A) e il secondo anticorpo (scimmia anti-topo) vengono premiscelati con un carrier (normale siero di topo) per produrre un unico reagente denominato Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

Per stabilire i livelli di ciclosporina con questo kit, i campioni di sangue intero, i calibratori e i controlli vengono dapprima estratti con metanolo. Gli estratti vengono quindi combinati con tracciante etichettato con iodio-125 e Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Dopo un'ora di incubazione, le provette vengono centrifugate, lasciate decantare e quindi contate. La quantità di radioattività rimanente nel precipitato è inversamente pro-porzionale alla concentrazione di ciclosporina presente nel campione.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (BLU)	1 fiala/9 mL
Calibratori CYCLO-Trac SP (0-6)	1 fiala/2 mL, 5 fiale/1 mL
CYCLO-Trac SP ImmunoSep	2 fiale/100 mL
Tracciante CYCLO-Trac SP (ROSSO)	1 fiala/20 mL
Controlli CYCLO-Trac SP	2 fiale/1 mL
Numero di test	200

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Non si devono mescolare reagente di lotti diversi.

4.1 CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blu): reagente pronto all'uso
La premiscela di siero scimmia anti-topo/normale siero di topo è diluita in soluzione salina con tampone fosfatico contenente 0.08% sodio azide e una sostanza surfactante. È stato aggiunto colorante blu. **Agitare energicamente immediatamente prima dell'uso.**

4.2 Calibratori CYCLO-Trac SP (0-6): reagente pronto all'uso
Il siero privo di ciclosporina contiene 0.1% sodio azide e una sostanza surfactante. Sei calibratori per ciclosporina, a concentrazioni normali varianti fra 0-1200 ng/mL, sono prediluiti nel siero umano contenente 0.1% sodio azide e una sostanza surfactante. I valori esatti delle concentrazioni vengono assegnati in base al lotto e sono indicati sulle etichette delle fiale. Il calibratore DiaSorin CYCLO-Trac SP è stato calibrato in base allo standard di riferimento USP per ciclosporina. Eventuali confronti con altri prodotti o procedure devono essere fatti in base a questo standard di riferimento. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, come consigliato.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: reagente pronto all'uso
Anticorpo monoclonale topo anti-ciclosporina e premiscela siero scimmia anti-topo/normale siero di topo diluito in soluzione salina con tampone fosfatico contenente 0.08% sodio azide e una sostanza surfactante. **Agitare energicamente immediata-mente prima dell'uso**.

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (rosso): reagente pronto all'uso
Un derivato della ciclosporina è etichettato con iodio-125 e diluito in un tampone citrato-EDTA che contiene 0.05% sodio azide, siero umano e una sostanza surfactante. È stato aggiunto colorante rosso.

4.5 Controlli CYCLO-Trac SP (livello 1 e livello 2): reagente pronto all'uso
Nel siero umano è aggiunta una quantità necessaria di ciclosporina A in modo da ottenere una concentrazione nei range specificati. I range per ogni lotto sono stampati sulle fiale dei controlli inclusi in ogni kit. Vengono aggiunti 0,1% sodio azide ed altri stabilizzanti.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.
Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuali dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,” nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, 1976.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)
R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).
R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 9 µCi (333 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.

5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

6.1 La presenza di particolato anomalo in uno qualsiasi dei reagenti.

6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.

6.3 Una diminuzione del legame massimo.

6.4 Un legame altamente non specifico.

6.5 Scarsa riproducibilità fra i duplicati.

7. PRELIEVO DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Sono richiesti cento microlitri di sangue intero EDTA per la procedura di estrazione con CYCLO-Trac SP.

NOTA: Non usare campioni contenenti eparina.[19, 27]

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEL SANGUE INTERO

Prelevare il sangue mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. Si consiglia di usare EDTA (7.2 mg/5 mL di sangue) come anticoagulante. Non sono richiesti altri additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione. Se i campioni non vengono utilizzati immediatamente, possono essere conservati a 2-8°C o a temperatura inferiore fino a 7 giorni. Per tempi di conservazione più lunghi (fino a 3 mesi), i campioni dovranno essere congelati a -20°C o a temperatura inferiore.[28, 29]

I campioni di sangue intero che sono stati conservati a temperatura di 4°C, o che non sono stati lavorati immediatamente, devono essere mescolati accuratamente prima di prelevare campioni da analizzare con il kit CYCLO-Trac SP Sangue intero.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

8.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.

8.2 Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm.

8.3 Contatore ad emissione di scintille gamma adatto per il conteggio di iodio-125.

8.4 Mixer Vortex.

8.5 Dispositivi per operazioni con pipetta:

- **a.** Pipette a sostituzione positiva da 400 µL, 100 µL e 50 µL.
- **b.** Dosatori a ripetizione calibrati per inviare 1.0 mL e 100 µL.

8.6 Metanolo (di grado HPLC).

8.7 Cappucci per le provette di estrazione (Scientific Products N. T1226-32).

9. PROCEDURA DI ANALISI

9.1 Etichettare 12 provette in vetro da 75 mm per ogni calibratore, controllo e campione non noto.

9.2 Versare 400 µL di metanolo (di grado HPLC) in ogni provetta utilizzando una pipetta a sostituzione positiva.* Coprire le provette con pellicola qualora i campioni non siano ancora pronti.

9.3 Aggiungere nel metanolo i calibratori, i controlli e i campioni di sangue intero utilizzando una pipetta da 100 µL a sostituzione positiva.*

NOTA: Iniettare lentamente il campione tenendo la punta della pipetta leggermente sotto la superficie del metanolo.

9.4 Immediatamente dopo l'aggiunta del campione, chiudere ogni provetta e agitare nel vortex per 15 secondi.

9.5 Centrifugare le provette chiuse a 1600 x g** a 20-25°C per 5 minuti.

9.6 Fare attenzione che gli estratti non evaporino prima di iniettarli nelle provette di analisi.

9.7 Preparare 12 provette da 75 mm in base al protocollo dello Schema di analisi (sul retro della copertina).

9.8 Lasciare che i reagenti si stabilizzino a temperatura ambiente (20-25°C) prima di usarli per l'analisi.

9.9 Aggiungere i reagenti come indicato di seguito:

a. Provette per il conteggio totale
100 µL di ^{125}I CYCLO-Trac SP (rosso)

b. Provette per legame non specifico (NSB)
50 µL di calibratore 0 estratto
100 µL di ^{125}I CYCLO-Trac SP (rosso)
1.0 mL di CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blu) ben mescolato

c. Calibratore 0 CYCLO-Trac SP
50 µL di calibratore O CYCLO-Trac SP estratto
100 µL di ^{125}I CYCLO-Trac SP (rosso)

d. Calibratori CYCLO-Trac SP (A-E)
50 µL di calibratore CYCLO-Trac estratto
100 µL di ^{125}I CYCLO-Trac SP (rosso)

e. Controllo e campioni non noti
50 µL di campione estratto
100 µL di ^{125}I CYCLO-Trac SP (rosso)

9.10 Agitare energicamente il flacone di Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep; aggiungere immediatamente 1.0 mL di reagente ben mescolato in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale e NSB.

9.11 Agitare energicamente le provette nel Vortex e lasciare in incubazione per un'ora a 20-25°C.

9.12 Centrifugare le provette a 1600 x g** per 20 minuti a 20-25°C.

9.13 Far decantare immediatamente i liquidi superficiali da tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale, capovolgendole per un tempo massimo di 2 minuti. Asciugare le provette su carta assorbente per rimuovere eventuali gocce di liquido superficiale che possono essere rimaste sui bordi prima di riportare in posizione verticale.

9.14 Usando un contatore ad emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e delle provette per il conteggio totale per un tempo sufficiente a raggiungere la precisione statistica (vedere la sezione Limiti della procedura).

* In alternativa, è possibile estrarre 200 µL di campione con 800 µL di metanolo.

** $g = (1118 \times 10^{-8})$ (raggio in cm) $(rpm)^2$

10. COMMENTI ALLA PROCEDURA

10.1 Per ottenere la massima precisione ed esattezza, le fasi di estrazione con metanolo devono essere attentamente seguite; si devono utilizzare pipette a sostituzione positiva (SMI) per distribuire sia il metanolo sia i campioni. Le pipette a sostituzione positiva sono inoltre necessarie per trasferire 50 µL di estratto in ogni provetta di analisi.

10.2 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.

10.3 Provette monouso di alcuni costruttori possono dare legami non specifici elevati o provocare un maggiore scivolamento del precipitato.

10.4 I reagenti ImmunoSep devono essere agitati energicamente immediatamente prima dell'uso.

10.5 Se un campione dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, estrarre nuovamente il campione utilizzando un rapporto sangue: metanolo superiore a 1:4 (si consiglia 1:9 o 1:19). Moltiplicare i risultati dell'analisi per il fattore di correzione idoneo.

10.6 Se non è possibile lasciar decantare le provette nei 5 minuti dopo l'arresto della centrifuga, si consiglia di centrifugare nuovamente le provette.

10.7 Eseguire l'analisi immediatamente dopo la fase di estrazione.

11. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due controlli in ogni analisi per garantire la validità dei risultati di ogni analisi. Se si impiegano controlli non analizzati e non è stata stabilita una deviazione media e standard, tali deviazioni dovranno essere stabilite per ogni controllo sulla base di un minimo di dieci analisi. Si può quindi ottenere un range accettabile di valori per questi controlli utilizzando ±2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di Controllo della Qualità DiaSorin ha stabilito un range per i controlli inclusi nel kit. I range sono stampati sulle fiale dei controlli. Evitare di scambiare i reagenti del kit, ad eccezione del tracciante ^{125}I CYCLO-Trac SP.

Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si devono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare regolarmente i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit.

a. Conteggi totali

b. Legame massimo

Conteggi al minuto (CPM) della provetta del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.

c. Legame non specifico

CPM della provetta NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.

d. Pendenza della curva di calibrazione

Ad esempio, monitorare i punti a 80, 50 e 20% della linea del calibratore per la riproducibilità analisi-dopo-analisi.

12. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori. La curva dell'analisi CYCLO-Trac SP si ottiene mediante tracciamento della percentuale di B/B_0 rispetto alla concentrazione di log.

12.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione paziente.

12.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi per ottenere il CPM esatto.

12.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione paziente per il CPM corretto del calibratore 0.

$$\% \ B/B_0 = \frac{\text{CPM del calibratore o campione paziente - CPT di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0 - CPM di NSB}} \times 100$$

12.4 Utilizzando carta millimetrata semi-logaritmica a tre cicli, tracciare la percentuale di B/B_0 dei calibratori (asse Y) rispetto alla concentrazione corrispondente
(asse X).

12.5 Tracciare una curva di miglior interpolazione fra i punti.

12.6 Interpolare le concentrazioni di ciclosporina dei campioni paziente dalla curva di calibrazione.

Nella pratica, la maggior parte dei laboratori utilizza un sistema di riduzione dei dati su computer. DiaSorin consiglia di usare un programma a retta curvilinea o a interpolazione di curva logistica con 4 parametri (4PL).

NOTA: NON usare una scala di concentrazione lineare (asse X) e/o una scala logit B/B_0 (asse Y).

RIDUZIONE DEI DATI

Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin utilizza una retta curvilinea uniforme.

TABELLA I
Dati campione DiaSorin CYCLO-Trac SP Sangue intero

Provetta	CPM duplicato	CPM medio	CPM corretto	Percentuale Bound (B/T)	Percent. (B/B_0)	Konz. (ng/mL)
Conteggio totale	51.045	50.892				
	50.738					
NSB	1.221	1.328		2,6		
	1.434					
Calibratore 0	25.323	25.432	24.104	50,0		
	25.541					
Calibratori (ng/mL)						
A (20)	22.781	22.806	21.478		89,1	
	22.830					
B (61)	19.850	19.624	18.296		75,9	
	19.397					
C (154)	14.843	14.911	13.583		56,4	
	14.978					
D (379)	9.506	9.570	8.242		34,2	
	9.633					
E (1099)	4.893	4.858	3.530		14,6	
	4.823					
Campioni non noti						
1	16.225	16.122	14.794		61,4	126
	16.019					
2	9.764	9.570	8.242		34,2	379
	9.375					

I dati di campioni tipici e una curva di calibrazione sono riportati nella TABELLA I e nella FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

CURVA DI CALIBRAZIONE CYCLO-Trac® SP PER CAMPIONE DI SANGUE INTERO

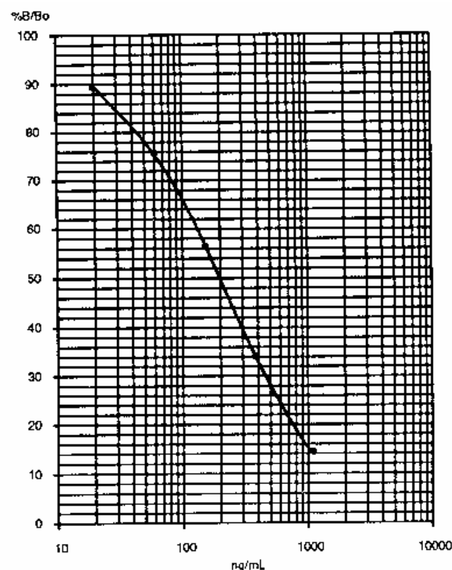


FIGURA 1

13. LIMITI DELLA PROCEDURA

13.1 I campioni non devono essere congelati e scongelati ripetutamente.

13.2 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici.

13.3 Gli anticorpi monoclonali, quali OKT3, sono stati presi in esame e non è stata notata alcuna interferenza nell'analisi.

14. VALORI PREVISTI

I livelli ematici terapeutici per la ciclosporina nei pazienti che hanno subito trapianto di rene, cuore e fegato non sono stati definitamente stabiliti. Ciò in parte è dovuto ai vari protocolli di cura per il trapianto eseguito, i metodi disponibili per la misurazione della ciclosporina e la concomitante somministrazione di altri farmaci immunosoppressivi con la ciclosporina.[19, 30, 31]

È stata eseguita una valutazione clinica del kit CYCLO-Trac SP Sangue intero presso gli ospedali universitari di London, Ontario e Albany, New York, su pazienti che hanno subito trapianti di rene, cuore e fegato. Durante tali valutazioni sono stati misurati i livelli di trough blood temporali. Sono stati esaminati i valori di trough blood dopo il trapianto da 4 a 90 giorni per rene (n = 10), cuore (n = 10) e fegato (n = 10) presso l'ospedale universitario di London nell'Ontario. Una simile valutazione è stata condotta su pazienti con trapianto di rene (n = 18) presso l'ospedale universitario di Albany, New York. Ad Albany, sono stati esaminati i livelli di trough blood dal giorno del trapianto per 199 giorni dopo il trapianto.

La TABELLA II indica i valori ematici di ciclosporina medi ed eventi significativi (rigetto o nefrotossicità) osservati in pazienti trapiantati dell'ospedale universitario di London in Ontario. Presso questo centro, i livelli ematici dei pazienti sono stati mantenuti da 400 a 650 ng/mL di ciclosporina a seconda del tipo di trapianto e delle condizioni cliniche del paziente.

TABELLA II

Valori temporali di ciclosporina nel sangue intero nei pazienti trapiantati di rene, cuore e fegato misurati con il kit CYCLO-Trac SP Sangue intero.

Giorno post operatorio	Rene[a] CyA (ng/mL)				Cuore[b] CyA (ng/mL)				Fegato[c] CyA (ng/mL)			
	N	Evento[d]	Media	D.S.	N	Evento[d]	Media	D.S	N	Evento[d]	Media	D.S.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Totale eventi		24				13				3		

[a] Ciclosporina: da 3,75 mg/kg a 5 mg/kg I.V. passando a 12 mg/kg in due dosaggi suddivisiappena possibile, prednisone 2-5 mg/kg con diminuzione a 20 mg/day, metilprednisо-lone 1-2 mg/kg. In assenza di funzione renale, la ciclosporina è stata sospesa ed è stato somministrato OKT3 5 mg/kg per 10 giorni.

[b] La ciclosporina è stata iniziata il terzo giorno post-operatorio 5 mg/kg in due dosaggi suddividi, prednisone 15 mg al giorno ridotti gradualmente, azatioprina in aggiunta come indicato, ALG 50 mg/kg somministrato una volta e continuato solo come indicato, OKT3 5 mg/kg I.V. per 7 giorni come indicato.

[c] Ciclosporina data per I.V. inizialmente con dose orale iniziata il quinto giorno a 4 mg/kg e mantenuta al livello ematico desiderato, prednisone 15 mg al giorno ridotto gradualmente, azatioprina 2-2.5 mg/kg e sospesa quando le piastrine iniziavano a diminuire, metilprednisolone 500 mg nel corso dell'intervento e 15 mg I.V. per 10 giorni, OKT3 5 mg/kg per 10 giorni.

[d] Nefrotossicità o rigetto.

La TABELLA III indica i valori ematici medi ed equivalenti livelli di creatinina in 18 pazienti trapiantati di rene presso l'ospedale universitario di Albany, New York.[32] Ad Albany, i pazienti sono stati mantenuti a livelli di trough blood di ciclosporina 100 - 300 ng/mL.

TABELLA III

Valori temporali di ciclosporina nel sangue intero in 18 pazienti con trapianto di rene misurati con il kit CYCLO-Trac SP Sangue intero.

Settimana	Giorno post[a] operatorio	Ciclosporina (ng/mL) N[b]	Media	D.S.	Livelli di creatinina (mg/dL) N	Media	D.S.	MÍN	MÁX
1	0-7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8-14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15-21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22-28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29-35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36-42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43-49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50-56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57-63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64-70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71-77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78-84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85-91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92-98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99-105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106-112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113-119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[a] Pazienti trattati con ciclosporina 2-5 mg/kg (ad intervalli di 12 ore), azatioprina 4 mg/kg prima dell'intervento e ridotto a 0,75 - 1,0 mg/kg, e metilprednisolone somministrato
in bolo di 300 mg, quindi regolato a 20 mg/giorno entro 30 giorni dopo il trapianto e 10 mg/giorno entro 60 giorni dopo il trapianto.

[b] Determinazioni di ciclosporina individuali.

I risultati di questi studi dimostrano che i livelli di ciclosporina nel sangue sono stati mantenuti ai livelli desiderati per ogni tipo di trapianto, come indicato dai protocolli per i trapianti utilizzati presso ogni centro.

Poiché la ciclosporina può produrre livelli ematici diversi in pazienti diversi, l'interpretazione dei risultati e la regolazione del dosaggio di ciclosporina deve considerare il periodo post-operatorio, altri farmaci somministrati e informazioni cliniche del caso concernenti il paziente.

INTERAZIONE DI FARMACI

Quanto segue è stato riferito dalla Sandoz LTD., Basilea, Svizzera per il farmaco Sandimmune[(r)] (ciclosporina):

La ciclosporina viene ampiamente metabolizzata dal fegato. Pertanto, il suo livello nel sangue intero può essere condizionato da farmaci che hanno effetto sugli enzimi microsomali epatici, in particolare il sistema citocromo P-450. Le sostanze note che inibiscono questi enzimi riducono il metabolismo epatico e aumentano i livelli di ciclosporina nel sangue intero.

I farmaci che sono stati indicati aumentare la concentrazione di ciclosposrina nel sangue intero sono danazolo, chetoconazolo, eritromicina, nicardipina, diltiazem, metiltestosterone e i contraccettivi orali. Le sostanze che inducono l'attività di citocromo P-450 aumentano il metabolismo epatico e diminuiscono i livelli di ciclosporina nel sangue intero.

I farmaci che sono stati indicati diminuire la concentrazione nel sangue intero di ciclosporina sono rifampicina, fenitoina, fenobarbitale, trimetoprim I.V. con sulfa-metossazolo e carbamazepina. Il monitoraggio di ciclosporina nel sangue e idonea regolazione del dosaggio sono indispensabili quando questi farmaci sono usati in concomitanza.

È stato notato che la clearance di prednisolone è minore nei pazienti trattati con ciclosporina e che i livelli di ciclosporina nel sangue intero, misurati mediante RIA, aumentano dopo la somministrazione di dosi elevate di metilprednisolone.

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Precisione

Variazioni intra-analisi (valori = ng/mL)

	Valore medio	D.S.	(% C.V.)	N
BASSO	46	4,9	10,7	25
MEDIO	186	6,0	3,2	25
ALTO	625	19,2	3,1	25

Risultati delle variazioni intra-analisi da uno studio di perizia multicentrico in cui sono stati usati campioni di sangue intero.

	Media ciclosporina (ng/mL)	D.S.	(% C.V.)	N
Centro 1*	91 203 543	15,0 27,9 53,7	16,5 13,7 9,9	5 5 5
Centro 2	71 173 466	6,7 12,9 41,5	9,5 7,58 8,9	5 5 5
Centro 3	78 195 500	5,4 18,4 50,2	6,8 9,4 10,0	5 5 5
Centro 4	87 200 505	6,9 13,5 42,5	7,9 6,8 8,4	5 5 5
Centro 5	78 192 497	3,6 10,2 23,9	4,6 5,3 4,8	5 5 5

* Indica variazione intra-analisi rilevata in un laboratorio all'inizio delle analisi-radioimmunologiche.

15.2 ACCURATEZZA: L'ACCURATEZZA DELL'ANALISI È STATA CONTROLLATA DA UN TEST DI LINEARITÀ E DA UN TEST DI RECUPERO.

Linearità (Parallelismo)

Recupero medio per 30 campioni diluiti in serie (range di concentrazione 132-1716 ng/mL).

$$\text{\% di recupero} = 100 \times \frac{\text{(fattore di diluizione x valore del campione diluito)}}{\text{(valore del campione non diluito)}}$$

Diluizione	1/2	1/4	1/8
% di recupero	96,1	93,3	95,9
D.S.	13,7	19,2	22,6
(% C.V.)	14,3	20,6	23,6

Precisione

Studio di recupero: Recuperi medi a 3 livelli di ciclosporina aggiunta per 5 campioni, 6 replicati ciascuno (n=30).

	Ciclosporina aggiunta (ng/mL)	% di recupero	D.S.	(% C.V.)
Livello 1	95	119	17	14
Livello 2	212	109	11	10
Livello 3	467	97	7	7

15.3 Sensibilità analitica (limiti di rilevazione)

Se definita come concentrazione apparente a 3 deviazioni standard dai conteggi a legame massimo, la sensibilità media dell'analisi CYCLO-Trac SP Sangue intero è 8.7 ng/mL (n=20).

15.4 Specificità analitica

Reattività incrociata media dei metaboliti di ciclosporina nell'analisi CYCLO-Trac SP Sangue intero. La reattività incrociata è così definita:

$$100 \times \frac{\text{(Concentrazione di ciclosporina al 50\% di } B/B_0\text{)}}{\text{(Concentrazione di metabolita al 50\% di } B/B_0\text{)}}$$

Metabolita ciclosporina	**% di reattività incrociata**
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Interferenza

Le seguenti sostanze sono state aggiunte in aliquote di un pool di sangue intero contenente ciclosporina (160-250 ng/mL). Nessuna di queste sostanze ha interferito con la misurazione della ciclosporina quando presente nelle concentrazioni indicate di seguito.

Sostanza	**Concentrazione**
Colesterolo	100-1000 mg/dL
Trigliceridi	300-1000 mg/dL
Bilirubina	5-30 mg/dL
Azatioprina	50-200 ng/mL
Cimetidina	500-1000 ng/mL
Nifedipina	100-200 ng/mL
6-metil-prednisolone	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

I farmaci indicati nell'elenco che segue, somministrati contemporaneamente, sono stati testati a livelli fino a 100 µg/mL e non sono stati notati interferire con l'analisi:

Acetaminofene	Lidocaina
N-Acetilprocainamide	Metoclopramide
Cefalosporine	Nafcillina
Cloramfenicolo	Penicillina
Digossina	Propranololo
Disopiramide	Rifampicina
Etosuccimide	Acido salicilico
Gentamicina solfato	Tobramicina
Kanamicina	Verapamil

Confronto fra l'analisi DiaSorin CYCLO-Trac SP Sangue intero e HPLC

Studio	Tipo di trapianto	Equazione lineare	Coefficiente di regressione	n
Farmacocinetica	N/D	Y = 0,9121X + 47	r = 0,9719	373
Università della Pennsylvania	Rene Cuore Fegato	Y = 0,8022X + 34 Y = 0,9196X + 50 Y = 0,9572X + 48	r = 0,9585 r = 0,9223 r = 0,9067	82 42 40
Albany Medical Center	Rene	Y = 1,038X + 27	r = 0,9124	187
University of Western Ontario	Rene Cuore Fegato	Y = 1,3074X + 29 Y = 1,4672X + 16 Y = 1,3575X - 12	r = 0,9703 r = 0,9696 r = 0,9067	73 75 63

I dati di correlazione presentati indicano i risultati degli studi effettuati in vari laboratori che utilizzano procedure HPLC convalidate indipendentemente. Nessun confronto dovrà essere fatto con questi dati, ed eventuale confronto di metodi deve essere fatto solo dopo aver ottenuto una attenta standardizzazione dei metodi.

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

KIT DE RADIOIMUNOENSAIO DE SANGUE TOTAL SP^{125}I CYCLO-TRAC®

1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

O kit de radioimunoensaio (RIA) de Sangue Total SP CYCLO-Trac® destina-se à medição quantitativa da ciclosporina (Ciclosporina A, Ciclosporina, Sandimmune®) no sangue total como forma de auxiliar na gestão de pacientes submetidos a transplantes do coração, dos rins e do fígado que estejam a receber ciclosporina.

ATENÇÃO: A LEI FEDERAL DOS E.U.A. RESTRINGE A VENDA E DISTRIBUIÇÃO DESTE DISPOSITIVO A, OU POR ORDEM DE, MÉDICOS OU LABORATÓRIOS CLÍNICOS; O SEU USO É RESTRITO A, OU POR ORDEM DE, UM MÉDICO. O KIT RIA SP CYCLO-TRAC DESTINA-SE A SER UTILIZADO EXCLUSIVAMENTE COM A CICLOSPORINA.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A ciclosporina (ciclosporina A, ciclosporina, ciclosporina, Sandimmune) é um undecapéptido cíclico de origem fúngica com poderosas propriedades imuno-supressoras.[1, 2] Ainda que o seu mecanismo de acção se encontre a ser estudado, a ciclosporina parece afectar o metabolismo dos linfócitos T "helper" e dos linfócitos T supressores, os quais debilitam o sistema imunitário.[3-5]

Apesar deste fármaco ter demonstrado a sua utilidade ao evitar a rejeição de novos órgãos transplantados,[6-9] também apresenta alguns efeitos adversos,[10,11] os mais graves dos quais são as nefro- e hepa-totoxicidades associadas aos níveis elevados deste fármaco no sangue[12-16] . Além disso, a absorção e o metabolismo da ciclosporina é altamente variável de paciente para paciente.[17-19] Assim, as dosagens devem ser individualizadas e monitorizadas de forma a ser possível alcançar uma imunosupressão óptima e a minimizar os efeitos laterais adversos.[18,19] A quase totalidade da ciclosporina presente no sangue total está ligada aos glóbulos vermelhos e às proteínas plasmáticas.[20-22] Esta distribuição é afectada por variações da temperatura e dos hematócritos.[21,22] Para assegurar resultados consistentes, é necessário um protocolo normalizado para a recolha de sangue.[19]

Estão actualmente disponíveis dois métodos para monitorizar os níveis de ciclosporina nos pacientes: a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e o radioimunoensaio (RIA). Os radioimunoensaios de primeira geração utilizavam anticorpos policlonais que apresentavam uma elevada reactividade cruzada com os metabólitos em circulação.[23] Os valores de ciclosporina gerados por esses radioimunoensaios excediam invariavelmente os valores gerados pela HPLC.[24] Os radioimunoensaios de segunda geração baseiam-se em tecnologias de anticorpos monoclonais.[25] Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais específicos e não específicos. O anticorpo específico mede apenas o composto precursor da ciclosporina e gera valores semelhantes aos obtidos pela HPLC. O anticorpo não específico mede o composto precursor e os metabólitos, produzindo resultados semelhantes aos obtidos pelos radioimunoensaios de primeira geração.[26]

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O radioimunoensaio de Sangue Total SP CYCLO-Trac da Diasorin emprega um anticorpo monoclonal específico que mede apenas a ciclosporina e que não demonstra qualquer reactividade cruzada significativa com os seus metabólitos. Antes do ensaio, é necessária uma fase de extracção do metanol para os calibradores, os controlos e as amostras. O próprio ensaio consiste numa única etapa de incubação e utiliza uma técnica de separação da fase do anticorpo duplo. Para simplificar o procedimento, o primeiro anticorpo (monoclonal de rato específico da Ciclosporina A), e o segundo anticorpo (anti-rato de burro) são previamente misturados com um catalisador (soro de rato normal) para produzir um reagente único designado Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

Para determinar os níveis de ciclosporina com este kit, as amostras de sangue total, os calibradores e os controlos começam por ser extraídos com metanol. Os extractos de metanol são depois combinados com iodo-125 rotulado como traçador da ciclosporina e com Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Após 1 hora de incubação, os tubos são centrifugados, decantados, e depois, contabilizados. A quantidade de radioactividade restante na pastilha é inversamente proporcional à concentração de ciclosporina presente na amostra.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

ImmunoSep CYCLO-Trac SP NSB (AZUL)	1 frasco/9 mL
Calibradores (0-6) CYCLO-Trac SP	1 frasco/2 mL, 5 frascos/1 mL
ImmunoSep CYCLO-Trac SP	2 frascos/100 mL
Traçador CYCLO-Trac SP (VERMELHO)	1 frasco/20 mL
Controlos CYCLO-Trac SP	2 frascos/1 mL
Número de testes	200

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8°C. Depois de abrir, armazene cada reagente a 2-8°C até à data de validade no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após a data de validade. A data de validade do kit é indicada no rótulo externo e corresponde à data de validade do traçador.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 ImmunoSep NSB CYCLO-Trac SP (azul): reagente pronto a usar
A pré-mistura de soro anti-rato de burro/soro de rato normal é diluída em salina de tampão fosfato com 0,08% de azida de sódio e um surfactante. É adicionado corante azul. **Agite vigorosamente imediatamente após a utilização.**

4.2 Calibradores (0-6) CYCLO-Trac SP: reagente pronto a usar

O soro sem ciclosporina contém 0,1% de azida de sódio e um surfactante. Os seis calibradores de ciclosporina, em concentrações nominais entre 0-1200 ng/mL, são pré-diluidos em soro humano com 0,1% de azida de sódio e um surfactante. Os valores exactos da concentração são atribuídos de acordo com cada lote, sendo indicados nos rótulos dos frascos. O calibrador SP CYCLO-Trac da Diasorin foi calibrado em relação ao padrão de referência USP Ciclosporina. Qualquer comparação com outros produtos ou procedimentos deve ser feita utilizando este padrão de referência. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com as amostras de pacientes quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico in vitro tal como recomendado.

4.3 ImmunoSep Anti-CYCLO-Trac SP: reagente pronto a usar
O anticorpo monoclonal anti-ciclosporina de rato e a pré-mistura de soro anti-rato de burro/soro de rato normal são diluídos numa solução de tampão fosfato com 0,08% de azida de sódio e um surfactante. **Agite vigorosamente imediatamente antes de utilizar**.

4.4 SP ^{125}I CYCLO-Trac (vermelho): reagente pronto a usar
Um derivado da ciclosporina é rotulado com iodo-125 e diluído em tampão EDTA de citrato, o qual contém 0,05% de azida de sódio, soro humano e um surfactante. É adicionado corante vermelho.

4.5 Controlos CYCLO-Trac SP (nível 1 e nível 2): reagente pronto a usar
O soro humano é enriquecido com a quantidade adequada de ciclosporina A para obter uma concentração dentro do intervalo especificado. Os intervalos para cada lote estão impressos nos frascos dos controlos incluídos em cada kit. São adicionados 0,1% de azida de sódio e outros estabilizadores.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.
Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM MATERIAL DE FONTE HUMANA

Trate como se fossem potencialmente infecciosos.

Cada unidade de doador de soro/plasma usados na preparação deste produto foi testado por um método aprovado pelo FDA americano e determinado como não reactivo para a presença de HBsAg, anticorpo para HCV e anticorpo para HIV 1/2. Apesar destes métodos serem bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus da imunodeficiência (VIH) ou de outros agentes infecciosos, todos los produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, “Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos,” (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 4ª edição, Maio 1999, ou edição actual.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte “Descontaminação de drenos de pias de laboratórios para remover sais de azidas,” no Manual Guia-Gestão de Segurança Nº CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)
R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.
R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.
S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

REAGENTES COM IODO-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 9 µCi (333 kBq) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebam rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão chegou a acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguidas lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT

6.1 A presença de partículas anormais em qualquer um dos reagentes.

6.2 Um deslocamento na inclinação ou na posição da curva do calibrador em relação à que é normalmente obtida.

6.3 Uma diminuição na ligação máxima.

6.4 Uma ligação não específica alta.

6.5 Reprodutibilidade deficiente entre duplicados.

7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE ESPÉCIMES

São necessários cem microlitros de sangue total EDTA para o procedimento de extracção do sangue total CYCLO-Trac SP~.

NOTA: Não utilize amostras heparinadas.[19, 27]

RECOLHA E ARMAZENAMENTO DE SANGUE TOTAL

Recolha o sangue por intermédio de venipunctura num tubo de vidro evacuado de 5 ou de 10 mL. O EDTA (7,2 mg/5 mL de sangue) deve ser usado como anticoagulante. Não são necessários mais aditivos ou preservativos para manter a integridade da amostra. Se não utilizar os espécimes imediatamente, armazene-os a 2-8°C ou a uma temperatura inferior durante um máximo de 7 dias. Para um armazenamento mais prolongado (até 3 meses) congele as amostras a -20°C ou a temperaturas inferiores.[28, 29]

As amostras de sangue total que tenham sido armazenadas a 4°C, ou que não tenham sido imediatamente processadas, devem ser bem misturadas antes de extrair amostras para testar no kit de sangue total CYCLO-Trac SP.

8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, NÃO FORNECIDOS

8.1 Tubos de vidro descartáveis de borosilicato, 12 x 75 mm.

8.2 Centrifugador controlado por temperatura para acomodar tubos de 12 x 75 mm.

8.3 Contador de cintilação gama capaz de contar iodo-125.

8.4 Misturador de vórtice.

8.5 Dispositivos para pipetar:

- **a.** pipetas volumétricas de 400 µL, 100 µL e 50 µL.
- **b.** Distribuidores de repetição calibrados para administrar 1,0 mL e 100 µL.

8.6 Metanol (grau de HPLC).

8.7 Tampas para os tubos de extracção (Produtos Científicos Nº. T1226-32).

9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

9.1 Rotule um tubo de vidro de 12 x 75 para teste por cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.

9.2 Deite 400 µL de metanol (grau de HPLC) em cada tubo usando uma pipeta volumétrica.* Tape os tubos com parafilme se as amostras ainda não estiverem preparadas para serem adicionadas.

9.3 Adicione os calibradores, os controlos e as amostras de sangue total ao metanol utilizando uma pipeta volumétrica de 100 µL.*

NOTA: Deite lentamente cada amostra com a ponta da pipeta colocada ligeiramente abaixo da superfície do metanol.

9.4 Imediatamente depois de adicionar a amostra, tape cada tubo e misture durante 15 segundos.

9.5 Centrifugue os tubos tapados utilizando 1600 x g** a 20-25°C durante 5 minutos.

9.6 Seja cuidadoso para não permitir que os extractos de metanol evaporem antes de pipetar os tubos de ensaio.

9.7 Prepara tubos de teste de 12 x 75 mm rotulados de acordo com o Esquema do Ensaio protocolar (contra-capa).

9.8 Deixe os reagentes equilibrarem à temperatura ambiente (20-25°C) antes de os utilizar no ensaio.

9.9 Adicione reagentes da seguinte forma:

a. Tubos de contagem total
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (vermelho)

b. Tubos de ligação não específica (NSB)
50 µL de calibrador 0 extraído
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (vermelho)
1,0 mL ImmunoSep CYCLO-Trac SP NSB bem misturado (azul)

c. Calibrador 0 CYCLO-Trac SP
50 µL de calibrador 0 CYCLO-Trac SP extraído
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (vermelho)

d. Calibradores CYCLO-Trac SP (A-E)
50 µL de calibrador CYCLO-Trac extraído
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (vermelho)

e. Controlos e amostras desconhecidas
50 µL de amostra extraída
100 µL de ^{125}I CYCLO-Trac SP (vermelho)

9.10 Agite o frasco de ImmunoSep Anti-CYCLO-Trac SP vigorosamente; adicione imediatamente 1,0 mL de reagente bem misturado a todos os tubos excepto os tubos de contagem total e os tubos NSB.

9.11 Misture vigorosamente os tubos e incube-os durante 1 hora a 20-25°C.

9.12 Centrifugue os tubos usando 1600 x g** durante 20 minutos a 20-25°C.

9.13 Decante imediatamente os sobrenadantes de todos os tubos excepto dos tubos de contagem total, invertendo-os durante um período máximo de 2 minutos. Seque os tubos com papel absorvente para remover quaisquer gotas de sobrenadante que possam ter permanecido nas beiras antes de virar os tubos para cima.

9.14 Utilizando um contador de cintilação gama, conte o precipitado de cada tubo e os tubos de contagem total durante um período de tempo suficiente para atingir precisão estatística (consulte a secção Limitações do Procedimento).

* Em alternativa, poderá extrair 200 µL de amostra com 800 µL de metanol.

** $g = (1.118 \times 10^{-8})$ (raio em cm) (rpm)^2

10. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO

10.1 De forma a obter o máximo de precisão, os passos de extracção do metanol devem ser cuidadosamente seguidos; utilize sempre volumétricas (SMI) para deitar o metanol e as amostras. Também são necessárias pipetas volumétricas para transferir 50 µL de extracto de metanol para cada tubo de ensaio.

10.2 Adicione cada alíquota de reagente ao terço inferior do tubo de ensaio para garantir a mistura completa dos reagentes.

10.3 Os tubos descartáveis de alguns fabricantes poderão produzir ligações não específicas elevadas ou provocar um maior deslizamento da pastilha.

10.4 Os reagentes ImmunoSep devem ser bem misturados imediatamente antes de serem usados.

10.5 Se uma amostra apresentar uma leitura superior ao calibrador mais alto, volte a extrair a amostra usando uma relação sangue: metanol superior a 1:4 (recomendam-se as relações 1:9 ou 1:19). Multiplique os resultados do ensaio pelo factor de correcção adequado.

10.6 Se não conseguir decantar os tubos num período de 5 minutos após a conclusão da centrifugação, recomenda-se que volte a centrifugar os tubos.

10.7 Execute o ensaio imediatamente após a fase de extracção.

11. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir pelo menos duas amostras de controlo em cada ensaio para assegurar a validade dos resultados de cada ensaio. Se estiver a utilizar controlos não ensaiados e ainda não tiver estabelecido um meio e um desvio padrão, deverá então determinar um meio e um desvio padrão para cada controlo, utilizando um mínimo de dez ensaios. Conseguirá então obter um intervalo aceitável de valores para esses controlos usando ±2 desvios padrão dos valores previamente determinados. O Laboratório de Controlo de Qualidade da DiaSorin determinou um intervalo para os controlos incluídos neste kit. Esses intervalos estão impressos nos frascos dos controlos. Não se recomenda a permuta dos reagentes do kit, com a excepção do traçador ^{125}I CYCLO-Trac SP.

Para um laboratório monitorizar completamente o desempenho consistente de um ensaio RIA, será necessário verificar alguns factores adicionais. A DiaSorin sugere a verificação regular dos parâmetros seguintes para assegurar o desempenho consistente do kit.

a. Contagens totais

b. Ligação máxima

Contagens por minuto (CPM) do tubo do calibrador 0/ CPM média dos tubos de contagem total.

c. Ligação não específica

CPM do tubo NSB/CPM média dos Tubos de Contagem Total.

d. Inclinação da curva do calibrador

Por exemplo, monitorize os pontos 80, 50 e 20% da linha do calibrador para uma reprodutibilidade ensaio a ensaio.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Existem diversos métodos para calcular os resultados dos radioimunoensaios. Cada um baseia-se na obtenção de uma curva de calibragem desenhando a extensão da ligação em relação às concentrações dos calibradores. A curva do ensaio CYCLO-Trac SP é obtida marcando a % B/B_0 vs. a concentração do registo.

12.1 Calcule a CPM média para cada calibrador, controlo e amostra do paciente.

12.2 Subtraia a CPM média dos tubos NSB a todas as contagens para obter a CPM corrigida.

12.3 Divida a CPM corrigida de cada calibrador, controlo ou amostra do paciente pela CPM corrigida do calibrador 0.

$$\% \ B/B_0 = \frac{\text{C CPM do calibrador ou da amostra do paciente – CPT de NSB}}{\text{CPM do calibrador 0 – CPM de NSB}} \times 100$$

12.4 Usando papel de gráfico semi-log de três ciclos, marque a % B/B_0 dos calibradores (eixo Y) em relação à respectiva concentração (eixo X).

12.5 Desenhe uma curva de melhor ajuste através dos pontos.

12.6 Faça a interpolação das concentrações de ciclosporina das amostras do paciente presentes na curva de calibragem.

Na prática, muitos laboratórios utilizarão um sistema de redução de dados informatizado. A DiaSorin recomenda a utilização de um "spline" ou de um programa de ajuste da curva logística de 4 parâmetros (4PL).

NOTA: NÃO utilize uma escala de concentração linear (eixo X) e/ou uma escala B/B_0 logit (eixo Y).

DADOS DE REDUÇÃO

O Laboratório de controlo de qualidade da DiaSorin usa um ajuste de curva spline suave.

TABELA I
Dados da amostra de sangue total CYCLO-Trac SP DiaSorin

Tubo	CPM duplicada	CPM média	CPM corrigida	Percentagem de Ligação (B/T)	Percentagem (B/B_0)	Conc. (ng/mL)
Contagem total	51.045	50.892				
	50.738					
NSB	1.221	1.328		2,6		
	1.434					
Calibrador 0	25.323	25.432	24.104	50,0		
	25.541					
Calibradores (ng/mL)						
A (20)	22.781	22.806	21.478		89,1	
	22.830					
B (61)	19.850	19.624	18.296		75,9	
	19.397					
C (154)	14.843	14.911	13.583		56,4	
	14.978					
D (379)	9.506	9.570	8.242		34,2	
	9.633					
E (1099)	4.893	4.858	3.530		14,6	
	4.823					
Amostras desconhecidas						
1	16.225	16.122	14.794		61,4	126
	16.019					
2	9.764	9.570	8.242		34,2	379
	9.375					

Os dados típicos de amostras e a curva de calibragem são indicadas na TABELA I e na FIGURA 1; esta informação serve apenas como referência e não deve ser utilizada para calcular qualquer valor.

Curva de calibragem da amostra de sangue total CYCLO-Trac® SP

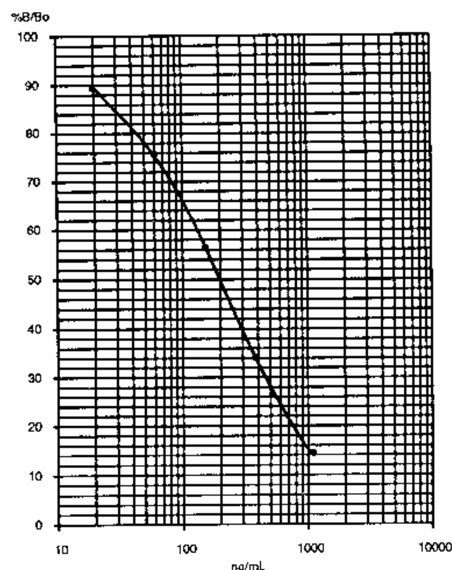


FIGURA 1

13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

13.1 Os espécimes não devem ser congelados e cortados várias vezes.

13.2 Os tempos de contagem devem ser os suficientes para evitar erros estatísticos.

13.3 Procedeu-se à avaliação de anticorpos monoclonais tais como o OKT3, tendo ficado demonstrado que não interferem no ensaio.

14. VALORES ESPERADOS

Os níveis sanguíneos terapêuticos de ciclosporina nos pacientes sujeitos a transplantes de rins, do coração ou do fígado ainda não foram claramente definidos. Tal, ficou em parte a dever-se aos variados protocolos de tratamento para os transplantes praticados, aos métodos disponíveis para medir a ciclosporina e à administração concomitante de outros fármacos imunosupressores com a ciclosporina.[19, 30, 31]

A avaliação clínica utilizando o kit de sangue total CYCLO-Trac SP foi realizada nos Hospitais das Universidades de London, Ontario e Albany, New York, em pacientes sujeitos a transplantes dos rins, do coração e do fígado. Estas avaliações mediram os níveis mínimos de ciclosporina no sangue ao longo do tempo em pacientes sujeitos a transplantes. Observaram-se valores mínimos no sangue no período pós-transplante entre o 4º dia e o 90º dia, nos pacientes sujeitos a transplante dos rins (n = 10), do coração (n = 10), e do fígado (n = 10) no Hospital da Universidade de London, Ontario. Além disso, foi feita uma avaliação semelhante nos pacientes sujeitos a transplante dos rins (n = 18) no Hospital da Universidade de Albany, New York. Em Albany, foram observados níveis mínimos no sangue, desde a altura do transplante até 199 dias pós-transplante.

A TABELA II mostra os valores médios de ciclosporina no sangue e os eventos significativos (rejeição ou nefrotoxicidade) observados nos pacientes sujeitos a transplantes no Hospital da Universidade de London, Ontario. Nesse centro, os níveis de ciclosporina no sangue dos pacientes foram mantidos entre 400 a 650 ng/mL, dependendo do tipo de transplante e da condição clínica dos pacientes.

TABELA II

Valores temporais de ciclosporina no sangue total em pacientes submetidos a transplantes dos rins, do coração e do fígado medidos com o Kit de Sangue Total CYCLO-Trac SP.

Dia Pós-operativo	Rins[a] CyA (ng/mL)				Coração[b] CyA (ng/mL)				Fígado[c] CyA (ng/mL)			
	N	Evento [d]	Media	D.S.	N	Evento[d]	Media	D.S	N	Evento [d]	Media	D.S.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Totale eventi		24				13				3		

[a] Ciclosporina: I.V. de 3,75 mg/kg a 5 mg/kg modificando para 12 mg/kg em duas doses divididas logo que possível, 2-5 mg/kg de prednisona com redução para 20 mg/dia, 1-2 mg/kg de metilpredniso-lona. Nos casos de não funcionamento dos rins, a ciclosporina foi descontinuada, sendo fornecidos 5mg/kg de OKT3 durante 10 dias.

[b] A administração de ciclosporina teve início no 3º dia pós-operativo com 5 mg/kg em duas doses divididas, 15 mg de prednisona por dia com redução gradual, adicionando azatioprina consoante o necessário, 50 mg/kg de ALG administrado uma única vez e reutilizado consoante o necessário, 5 mg/kg de OKT3 por I.V. durante 7 dias consoante o necessário.

[c] A administração da ciclosporina por I.V., inicialmente através de dose oral, teve início no dia 5 com uma quantidade de 4 mg/kg tendo sido mantida no nível sanguíneo pretendido, 15 mg de prednisona diariamente com diminuição gradual, 2-2,5 mg/kg de azatioprina descontinuada quando as plaquetas começaram a decrescer, 500 mg de metilprednisolona intraoperativamente e 15 mg através de I.V. durante 10 dias, 5 mg/kg de OKT3 durante 10 dias.

[d] Nefrotoxicidade ou rejeição.

A TABELA III mostra os valores médios de ciclosporina no sangue e os níveis correspondentes de creatinina em 18 pacientes sujeitos a transplante dos rins no Hospital da Universidade de Albany, New York.[32] Em Albany, os pacientes foram mantidos a níveis mínimos de ciclosporina, entre 100 a 300 ng/mL.

TABELA III

Valores temporais de ciclosporina no sangue total em 18 pacientes sujeitos a transplantes dos rins medidos com o Kit de Sangue Total CYCLO-Trac SP.

Semana	Dia Pós[a] Operativo	N[b]	Ciclosporina (ng/mL) Média	D.S.	N	Niveles de creatinina (mg/dL) Média	D.S.	MIN	MÁX
1	0-7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8-14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15-21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22-28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29-35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36-42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43-49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50-56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57-63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64-70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71-77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78-84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85-91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92-98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99-105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106-112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113-119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[a] Pacientes tratados com 2-5 mg/kg de ciclosporina (em intervalos de doze horas), 4 mg/kg de azatioprina no período pré-operação e reduzido para 0,75 a 1,0 mg/kg, e metilprednisolona administrada como um "bolus" de 300 mg e posteriormente ajustada para 20 mg/dia 30 dias após o transplante e para 10 mg/dia 60 dias após o transplante.

[b] Determinações individuais da ciclosporina.

Os resultados deste estudos demonstraram que os níveis da ciclosporina no sangue se mantiveram dentro dos níveis sanguíneos pretendidos para cada tipo de transplante, tal como indicado para os protocolos de transplante utilizados por cada centro.

Como a ciclosporina consegue produzir níveis sanguíneos diferentes em pacientes diferentes, a interpretação dos resultados e o ajuste da dosagem de ciclosporina devem ser tidos em consideração no período pós-transplante, devendo ser administrados outros medicamentos e obtidas informações clínicas relevantes relativas ao paciente.

INTERACÇÕES DOS FÁRMACOS

Relatório emitido pela Sandoz LTD., Basileia, Suíça para o fármaco Sandimmune® (ciclosporina):

A ciclosporina é extensamente metabolizada pelo fígado. Por essa razão, o seu nível no sangue total pode ser influenciado pelos fármacos que afectam as enzimas microssomáticas hepáticas, particularmente o sistema citocromo P-450.

As substâncias que inibem essas enzimas diminuirão o metabolismo hepático e aumentarão os níveis de ciclosporina no sangue total. Os fármacos que provocam o aumento da concentração de ciclosporina no sangue total incluem o danazol, o cetoconazole, a eritromicina, a nicardipina, o diltiazem, o metiltestosterona e os contraceptivos orais. As substâncias que induzem a actividade do citocromo P-450 aumentarão o metabolismo hepático e diminuirão os níveis de ciclosporina no sangue total.

Os fármacos que foram considerados como diminuidores da concentração de ciclosporina no sangue total incluem a rifampina, a fenitoína, o fenobarbital, o trimetoprim I.V. com sulfametoxazol e a carbamazepina. A monitorização dos níveis de ciclosporina no sangue e o ajuste da dosagem adequada são essenciais sempre que estes fármacos forem utilizados concomitantemente.

Descobriu-se que a eliminação de prednisolona é reduzida em pacientes tratados com ciclosporina e que os níveis de ciclosporina no sangue total, tal como medidos pelo RIA, aumentam após a administração de uma dose elevada de metilprednisolona.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

15.1 Precisão

Variação durante o ensaio (valores = ng/mL)

	Valor médio	D.S.	(% C.V.)	N
BAIXO	46	4,9	10,7	25
MÉDIO	186	6,0	3,2	25
ALTO	625	19,2	3,1	25

A variação durante o ensaio resulta de estudos de competência multi-centros utilizando amostras de sangue total.

	Ciclosporina média (ng/mL)	D.S.	(% C.V.)	N
Centro 1*	91	15,0	16,5	5
	203	27,9	13,7	5
	543	53,7	9,9	5
Centro 2	71	6,7	9,5	5
	173	12,9	7,58	5
	466	41,5	8,9	5
Centro 3	78	5,4	6,8	5
	195	18,4	9,4	5
	500	50,2	10,0	5
Centro 4	87	6,9	7,9	5
	200	13,5	6,8	5
	505	42,5	8,4	5
Centro 5	78	3,6	4,6	5
	192	10,2	5,3	5
	497	23,9	4,8	5

* Indica a variação entre ensaios observada num laboratório no início da execução dos radioimunoensaios.

15.2 PRECISÃO: A PRECISÃO DO ENSAIO FOI VERIFICADA PELO TESTE DE LINEARIDADE E PELO TESTE DE RECUPERAÇÃO.

Linearidade (Paralelismo)

Recuperação média para 30 amostras do paciente diferentes, diluídas em série (intervalo de concentração 132-1716 ng/mL).

$$\% \text{ Recuperação} = 100 \times \frac{(\text{factor de diluição x valor da amostra diluída})}{(\text{valor da amostra pura})}$$

Diluição	1/2	1/4	1/8
% Recuperação	96,1	93,3	95,9
D.S.	13,7	19,2	22,6
(% C.V.)	14,3	20,6	23,6

Precisão

Estudo de recuperação: Recuperações médias em 3 níveis de ciclosporina adicionada a 5 amostras, 6 réplicas de cada (n=30).

	Ciclosporina adicionada (ng/mL)	% Recuperação	D.S.	% C.V
Nível 1	95	119	17	14
Nível 2	212	109	11	10
Nível 3	467	97	7	7

15.3 Sensibilidade Analítica (Limites de detecção)

Quando definida como a concentração aparente em três desvios padrão das contagens na ligação máxima, a sensibilidade média do Ensaio de Sangue Total CYCLO-Trac SP é de 8.7 ng/mL (n=20).

15.4 Especificidade analítica

Reactividade cruzada média dos metabólitos de ciclosporina no ensaio de Sangue Total CYCLO-Trac SP. A reactividade cruzada é definida como:

$$100 \times \frac{(\text{Concentração de ciclosporina a 50\% } B/B_0)}{(\text{Concentração de metabolitos a 50\% } B/B_0)}$$

Metabólitos da Ciclosporina	% Reactividade cruzada
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Interferência

As substâncias seguintes foram enriquecidas em alíquotas de conjuntos de sangue total com ciclosporina (160-250 ng/mL). Nenhuma dessas substâncias interferiu na medição da ciclosporina quando presentes nas concentrações listadas a seguir.

Substância	**Concentração**
Colesterol	100-1000 mg/dL
Triglicéridos	300-1000 mg/dL
Bilirrubina	5-30 mg/dL
Azatioprina	50-200 ng/mL
Cimetidina	500-1000 ng/mL
Nifedipina	100-200 ng/mL
6-metil-prednisolona	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

A lista seguinte de fármacos coadministrados foi testada até níveis de 100 µg/mL e considerada como não sendo interferente com o ensaio:

Acetaminofeno	Lidocaína
N-Acetilprocainamida	Metoclopramida
Cefalosporina	Naficilina
Cloramfenicol	Penicilina
Digoxina	Propranolol
Disopiramida	Rifampina
Etosuximida	Ácido Salicílico
Sulfato de gentamicina	Tobramicina
Canamicina	Verapamil

Comparação do Ensaio de Sangue Total CYCLO-Trac SP DiaSorin com a HPLC

Estudo	Tipo de transplante	Equação da linha	Coeficiente de regressão	n
Farmacocinético	N/D	Y = 0,9121X + 47	r = 0,9719	373
Universidade da Pensilvânia	Rins Coração Fígado	Y = 0,8022X + 34 Y = 0,9196X + 50 Y = 0,9572X + 48	r = 0,9585 r = 0,9223 r = 0,9067	82 42 40
Centro Médico de Albany	Rins	Y = 1,038X + 27	r = 0,9124	187
Universidade de Western Ontario	Rins Coração Fígado	Y = 1,3074X + 29 Y = 1,4672X + 16 Y = 1,3575X - 12	r = 0,9703 r = 0,9696 r = 0,9067	73 75 63

Os dados de correlação apresentados representam os resultados dos estudos efectuados em diversos laboratórios utilizando procedimentos de HPLC validados individualmente. Não deverão ser feitas comparações com estes dados, e qualquer comparação de métodos só deverá ser feita depois de se efectuar uma cuidadosa normalização dos métodos.

CONSULTE A ÚTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

CYCLO-TRAC® SP-WHOLE BLOOD ^{125}I RIA KIT

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Satsen CYCLO-Trac® SP Whole Blood radioimmunoassay (RIA) är avsedd för kvantitativ bestämning av ciklosporin (ciklosporin A, ciklosporin, Sandimmune®) i helblod för att underlätta uppföljning av hjärt-, njur- och levertransplanterade patienter som behandLas med ciklosporin.

FÖRSIKTIGT! ENLIGT AMERIKANSK FEDERAL LAG ÄR FÖRSÄLJNING OCH DISTRIBUTION AV DENNA UTRUSTNING ENDAST TILLÅTEN TILL LÄKARE ELLER PÅ LÄKARES FÖRESKRIFT ELLER TILL KLINISKA LABORATORIER; OCH UTRUSTNINGEN FÅR ENDAST ANVÄNDAS AV LÄKARE ELLER PÅ LÄKARES FÖRESKRIFT. CYCLO-TRAC SP RIA KIT ÄR ENDAST AVSEDD ATT ANVÄNDAS MED CIKLOSPORIN.

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Ciklosporin (Cyklosporin A, Ciklosporin, Cyklosporin, Sandimmun) är en cyklisk undekapeptid med svampursprung och starka immunhämmande egenskaper.[1,2] Även om det alltjämt pågår forskning kring dess verkningsmekanism, tycks det som om ciklosporin påverkar metabolismen hos både T-hjälparceller och T-suppressorceller, vilket hämmar immunsystemet.[3-5]

Även om det har visat sig att detta läkemedel är av värde för att förhindra avstötning av nytransplanterade organ,[6-9] har ett antal biverkningar rapporterats,[10,11] där de allvarligaste utgörs av njur- och levertoxiska effekter vid höga blodnivåer av medlet[12-16]. Dessutom varierar absorption och metabolisering kraftigt från patient till patient.[17-19] Således måste doseringen anpassas individuellt och noga följas upp för att man ska få optimal immunhämning med minsta möjliga biverkningar.[18,19] Nästan allt cyklosporin i helblod föreligger bundet till röda blodkroppar och plasmaproteiner.[20-22] Denna distribution påverkas av förändringar av temperatur och hematokrit.[21,22] För att säkerställa konse-kventa resultat krävs ett standardiserat protokoll för provtagningen.[19]

Det finns för närvarande två metoder att kontrollera ciklosporinnivåerna hos patienter: högpresterande vätskekromatografi (HPLC) och radioimmunoassay (RIA). I första generationens RIA-tester användes polyklonala antikroppar som uppvisar hög korsreaktivitet med cirkulerande metaboliter.[23] De ciklosporinvärden som erhölls med dessa tester låg konsekvent högre än dem man fick med HPLC.[24] Andra generationens RIA är baserade på monoklonala antikroppar.[25] Både specifika och ickespecifika monoklonala antikroppar har tagits fram. De specifika antikropparna mäter endast modersubstansen ciklosporin och ger ungefär samma värden som HPLC. De ickespecifika antikropparna mäter både modersubstansen och metaboliterna och ger ungefär samma resultat som första generationens RIA.[26]

3. ANALYSPRINCIP

I DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood RIA utnyttjas en specifik monoklonal antikropp som enbart mäter ciklosporin och ej uppvisar någon korsreaktivitet med metaboliter. Före assay måste man utföra ett extraktionssteg med metanol på kalibreringslösningar, kontroller och prover. Den egentliga assayen består av ett enda inkubationssteg och utnyttjar en teknik med fasseparation med dubbla antikroppar För att förenkla proceduren är primärantikroppen (monoklonal musantikropp specifik för cyklosporin A), och sekundärantikroppen (antimusantikropp från åsna) i förväg blandade med en bärare (normalt musserum), så att man får ett enda reagens, kallat Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

När man gör en ciklosporinbestämning med satsen extraherar man först helblodsprover, kalibreringslösningar och kontroller med metanol. Till metanolextrakten tillsätts sedan ciklosporin märkt med jod-125 och Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Efter 1 timmes inkubation centrifugeras rören, dekanteras och räknas därefter i gammaräknare. Den mängd radioaktivitet som finns kvar i pelletten är omvänt proportionell mot halten ciklosporin i provet.

4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (BLÅ)	1 flaska à 9 mL
CYCLO-Trac SP kalibreringslösningar (0-6)	1 flaska à 2 mL, 5 flaskor à 1 mL
CYCLO-Trac SP ImmunoSep	2 flaskor à 100 mL
CYCLO-Trac SP spårämne (RÖD)	1 flaska à 20 mL
CYCLO-Trac SP kontroller	2 flaskor/1 mL
Antal test	200

FÖRVARING: Oöppnad förpackning förvaras vid 2-8°C. När förpackningen öppnats förvaras varje reagens vid 2-8°C till det utgångsdatum som anges på etiketten. Reagensen får ej användas efter utgångsdatum. Utgångsdatum för satsen anges på etiketten på ytterförpackningen och motsvarar utgångsdatum för spårämnet.

Reagens från skilda batcher får ej blandas.

4.1 CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blå): reagens färdigt för användning
En färdig blandning av antimusserum från åsna/normalt musserum, spätt med PBS med tillsats av 0,08 % natriumazid och ett ytaktivt medel. Blått färgämne tillsatt. **Skakas kraftigt omedelbart före användning.**

4.2 CYCLO-Trac SP Calibrators (0-6): reagens färdiga för användning

Ciklosporinfritt serum med tillsats av 0,1% natriumazid och ett ytaktivt medel. Sex kalibreringslösningar med ciklosporin, med nominella halter på 0-1200 ng/mL, färdigspädda med humant serum med tillsats av 0,1% natriumazid och ett ytaktivt medel. De exakta koncentrationsvärdena anges för varje batch på etiketterna på flaskorna. Kalibreringslösningarna för DiaSorin CYCLO-Trac SP har kalibrerats mot USP:s referensstandard för ciklosporin. Alla jämförelser med andra produkter eller metoder skall ske med denna referensstandard som utgångspunkt. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover, när de används med de reagens och metodanvisningar om rekommenderas för detta diagnostiska in vitro-test.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: reagens färdigt för användning
En färdig blandning av en monoklonal musantikropp mot ciklosporin och antimusserum från åsna/normalt musserum, spätt med PBS med tillsats av 0,08 % natriumazid och ett ytaktivt medel. **Skakas kraftigt omedelbart före användning**.

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (röd): reagens färdigt för användning
Ett ciklosporinderivat märkt med jod-125, upplöst i citrat-EDTA-buffert med tillsats av 0,05 % natriumazid, humant serum och ett ytaktivt medel. Rött färgämne tillsatt.

4.5 CYCLO-Trac SP kontroller (nivå 1 och nivå 2): reagens färdiga för användning Humant serum med tillsats av lämplig mängd cyklosporin A för att erhålla en kontrollhalt inom det angivna området. Det specifika intervallet för varje batch anges på flaskorna med kontroller i varje sats. Med tillsats av 0,1 % natriumazid och andra stabiliseringsmedel.

5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.
Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

Behandlas som potentiellt smittfarligt.

Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk (FDA) och befunnits negativ vad gäller förekomst av HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder enligt handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga.

REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

FÖRSIKTIGT! Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1976.

Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)
R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 9 µCi (333 kBq) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:

Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laboratorietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens:

När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

VARNING! Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

OBSERVERA! Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETSFÖRSÄMRING HOS REAGENSEN I SATSEN

6.1 Förekomst av onormalt partikelformigt material i något av reagensen.

6.2 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som normalt erhålles.

6.3 En sänkning av maximal bindning.

6.4 En hög ospecifik bindning

6.5 Dålig reproducerbarhet mellan dubbelprover.

7. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Det behövs etthundra (100) mikroliter helblod med EDTA-tillsats för extraktionssteget inför assayen.

OBS! Heparinblod kan ej användas.[19, 27]

PROVTAGNING OCH FÖRVARING AV HELBLOD

Tag venprov i 5 eller 10 mL glasrör av vacutainertyp. EDTA (7,2 mg/5 mL blod) skall användas som antikoagulationsmedel. Inga andra tillsatser eller konserveringsmedel behövs för att hålla proverna intakta. Om proverna inte testas omedelbart ska de förvaras vid högst 2-8°C i upp till 7 dagar. För längre förvaring (upp till 3 månader) kan proverna hållas frysta vid -20°C eller kallare.[28, 29]

Helblodprover som förvarats vid 4°C, eller som inte har behandlats omedelbart, måste blandas noggrant innan man pipetterar blod som ska testas med satsen.

8. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

8.1 Engångs borosilikatrör, 12 x 75 mm.

8.2 Temperaturreglerad centrifug som passar för 12 x 75 mm-rör.

8.3 Gammaräknare som kan räkna jod-125.

8.4 Vortex-blandare.

8.5 Pipetteringshjälpmedel:

- **a.** pipetter med "positive displacement" för 400 µL, 100 µL och 50 µL.
- **b.** Repeterande dispensorer, kalibrerade för 1,0 mL och 100 µL.

8.6 Metanol (HPLC-kvalitet).

8.7 Proppar till extraktionsrör (Scientific Products nr T1226-32).

9. TESTPROCEDUR

9.1 Märk ett 12 x 75 mm glasprovrör för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.

9.2 Pipettera 400 µL metanol (HPLC-kvalitet) till varje rör med hjälp av en pipett med "positive displacement".* Sätt på parafilm på rören om proverna ännu inte är klara att tillsättas.

9.3 Tillsätt kalibreringslösningar, kontroller och blodprover till metanolen med hjälp av en 100 µL pipett med "positive displacement".*

OBS! Släpp ut proverna långsamt med pipettspetsen en liten bit under metanolytan.

9.4 Direkt när ett prov tillsatts sätter du i en propp och vortexar i 15 sekunder.

9.5 Centrifugera rören med propp vid 1600 x g** och 20-25°C i 5 minuter.

9.6 Var noga så att inte metanolextrakten förångas innan de pipetteras till assayrören.

9.7 Gör i ordning märkta 12 x 75 mm provrör enligt lathunden för assayen (på pärmens baksida).

9.8 Låt reagensen anta rumstemperatur (20-25°C) innan de används i assayen.

9.9 Tillsätt reagens enligt följande:

a. Rör för total aktivitet
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (röd)

b. Rör för ospecifik bindning (NSB)
50 µL extrakt från 0-kalibreringslösning
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (röd)
1,0 mL välblandad CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (blå)

c. CYCLO-Trac SP 0-kalibreringslösning
50 µL extrakt från CYCLO-Trac SP 0-kalibreringslösning
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (röd)

d. CYCLO-Trac SP kalibreringslösningar (A-E)
50 µL extrakt från CYCLO-Trac kalibreringslösning
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (röd)

e. Kontroller och okända prover
50 µL extrakt från provet
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (röd)

9.10 Skaka flaskan med Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep kraftigt; tillsätt genast 1,0 mL välblandat reagens till alla rör utom rören för total aktivitet och NSB.

9.11 Vortexa rören grundligt och inkubera dem 1 timme vid 20-25°C.

9.12 Centrifugera rören 20 minuter vid 1600 x g** och 20-25°C.

9.13 Dekantera genast supernatanten från alla rör utom totalaktivitetsrören genoma att vända dem upp och ner i högst 2 minuter. Håll rören mot absorberande papper för att få bort eventuella supernatantdroppar på kanterna, innan du vänder dem rätt igen.

9.14 Använd gammaräknare och räkna fällningen i varje rör samt total-aktivitetsrören under tillräckligt lång tid för att statistiskt säkra resultat ska erhållas. (Se avsnittet Metodbegränsningar.).

* Alternativt kan man extrahera 200 µL prov med 800 µL metanol.

** $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radie i cm) $(rpm)^2$

10. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

10.1 För att få största noggrannhet och precision måste man omsorgsfullt följa stegen i metanolextraktionen; pipetter med "positive displacement" (SMI) måste användas för pipettering av både metanol och prov. Även när man överför 50 µL metanolextrakt till varje assayrör måste pipetter med "positive displacement" användas.

10.2 Tillsätt alla reagens till den nedersta tredjedelen av provröret så att reagensen kan blandas fullständigt.

10.3 Engångsrör från vissa tillverkare kan ge en förhöjd ospecifik bindning eller gör att pellettarna glider mer i rören.

10.4 ImmunoSep-reagensen måste skakas kraftigt omedelbart före användning.

10.5 Om ett okänt prov ger ett högre värde än den högsta kalibreringslösningen, skall provet extraheras på nytt med en större kvot mellan blod och metanol än 1:4 (vi rekommenderar 1:9 eller 1:19). Multiplicera assayresultatet med lämplig korrektionsfaktor.

10.6 Om rören av någon anledning inte kan dekanteras inom 5 minuter efter det att centrifugen stannat, bör man centrifugera om dem.

10.7 Kör assayen direkt efter extraktionssteget.

11. KVALITETSKONTROLL

Alla laboratorier skall ta med minst två kontroller vid varje assay för att garantera att resultaten blir korrekta. Om man använder otestade kontroller som medelvärde och standardavvikelse inte har fastställts för, bestämmer man dessa värden genom att köra varje kontroll i minst tio assayer. Man kan få fram ett godkänt område för kontrollerna genom att använda ±2 standardavvikelser för de tidigare uppmätta värdena. DiaSorin Quality Control Laboratory har bestämt ett intervall för kontrollerna i satsen. Dessa intervall finns angivna på flaskorna med kontroller. Man bör ej blanda reagens från olika satser, med undantag för ^{125}I CYCLO-Trac SP spårämne.

För att kontinuerligt bekräfta att ett RIA-test ger konsekventa resultat måste laboratoriet kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man regelbundet kontrollerar följande parametrar för att vara säker på att satsen ger konsekventa resultat.

a. Totalaktivitet

b. Maximal bindning

Aktiviteten (CPM) för 0-kalibreringsröret/Medel-CPM för totalaktivitetsrören.

c. Ospecifik bindning

CPM för NSB-röret/Medel-CPM för totalaktivitetsrören.

d. Kalibreringskurvans lutning

Följ exempelvis kalibreringskurvans punkter för 80 %, 50 % och 20 % som en kontroll av reproducerbarheten mellan olika körningar.

12. RESULTATBERÄKNING

Det finns många olika metoder för att beräkna resultaten från RIA-test. Alla är baserade på att man tar fram en kalibreringskurva genom att plotta bindningsgraden mot de angivna koncentrationerna hos kalibreringslösningarna. Kurvan för CYCLO-Trac SP-assayen får man genom att plotta % B/B_0 mot logaritmen för koncentrationen.

12.1 Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och patientprov.

12.2 Subtrahera medel-CPM för NSB-rören från alla andra värden för att på så sätt få fram korrigerade CPM-värden.

12.3 Dividera det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning, kontroll och patientprov med det korrigerade CPM-värdet för 0-kalibreringslösningen.

$$\% \ B/B_0 = \frac{\text{CPM för kalibreringslösning eller patientprov - CPM för NSB}}{\text{CPM för 0-kalibreringslösningen - CPM för NSB}} \times 100$$

12.4 Använd ett lin-log-papper över tre tiopotenser och plotta procent B/B_0 för kalibreringslösningarna (på y-axeln) mot motsvarande koncentration (på x-axeln).

12.5 Rita en bästa anpassad linje genom punkterna.

12.6 Använd kurvan för att avläsa ciklosporinhalterna i patientproverna.

I praktiken använder de flesta laboratorier ett datorbaserat datareduktionssystem. DiaSorin rekommenderar att man använder ett spline-anpassningsprogram eller ett 4-parameters logistiskt (4PL) anpassningsprogram.

OBS! ANVÄND INTE en linjär koncentrationsskala (på x-axeln) och/eller en logaritmisk B/B_0-skala (på y-axeln).

DATAREDUKTION

DiaSorins kvalitetskontrollaboratorium använder en mjuk anpassning till SPLINE-funktioner.

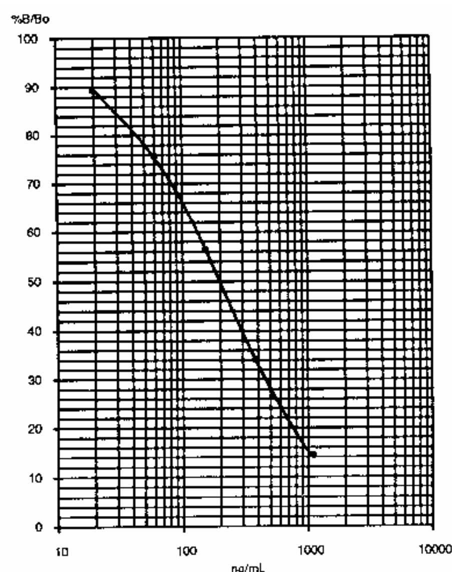
TABELL I

Exempeldata för DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood

Rör	CPM i dubbelprov	Medel-CPM	Korrigerad CPM	Procent bundet (B/T)	Procent (B/B_0)	diagr. (ng/mL)
Total aktivitet	51.045	50.892				
	50.738					
NSB	1.221	1.328		2,6		
	1.434					
Kalibrering -slösning	25.323	25.432	24.104	50,0		
	25.541					
Kalibreringslösningar (ng/mL)						
A (20)	22.781	22.806	21.478		89,1	
	22.830					
B (61)	19.850	19.624	18.296		75,9	
	19.397					
C (154)	14.843	14.911	13.583		56,4	
	14.978					
D (379)	9.506	9.570	8.242		34,2	
	9.633					
E (1099)	4.893	4.858	3.530		14,6	
	4.823					
Okända prover						
1	16.225	16.122	14.794		61,4	126
	16.019					
2	9.764	9.570	8.242		34,2	379
	9.375					

Typiska provdata och en kalibreringskurva visas i TABELL I och FIGUR 1; denna information är endast avsedd som ett exempel och ska inte användas för att beräkna några värden.

CYCLO-Trac® SP WHOLE BLOOD SAMPLE CALIBRATOR CURVE



FIGUR 1

13. METODBEGRÄNSNINGAR

13.1 Proverna får ej frysas och tinas flera gånger.

13.2 Aktiviteten i rören måste räknas under tillräckligt lång tid för att man ska kunna undvika statistiska fel.

13.3 Monoklonala antikroppar som OKT3 har testats och visat sig ej interferera med assayen.

14. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

De terapeutiska nivåerna av ciklosporin i blod hos njur-, hjärt- och levertransplanterade patienter är ej väl fastställda, vilket delvis beror på de varierande behandlingsprotokollen vid transplantationer, på de befintliga betoderna att mäta ciklosporin och på samtidig administrering av andra immunhämmande läkemedel.[19, 30, 31]

En klinisk utvärdering av CYCLO-Trac SP Whole Blood utfördes på universitetssjukhusen i London i den kanadensiska provinsen Ontario och i Albany i delstaten New York, på njur-, hjärt- och levertransplanterade patienter. I dessa studier mättes de temporala miniminivåerna i blodet hos de transplanterade patienterna. Miniminivåerna observerades efter transplantationen under 4 till 90 dagar hos patienter vid universitetssjukhuset i London, Ontario, som genomgått transplantation av njure (n = 10), hjärta (n=10) och lever (n=10). Dessutom genomfördes en liknande studie på njurtransplanterade patienter (n = 18) vid universitetssjukhuset i Albany, New York. I Albany observerades miniminivåerna i blod från transplantation till 199 dagar efter transplantation.

TABELL II visar medelvärdet för ciklosporinvärdena i blod och händelser av betydelse (avstötning eller njurtoxicitet) som iakttogs på transplantationspatienterna från universitetssjukhuset i London, Ontario. Vid detta center upprätthölls en ciklosporinhalt i patienternas blod på 400 - 650 ng/mL beroende på typ av transplantat och det kliniska tillståndet för patienterna.

TABELL II

Ciklosporinvärden i helblod som funktion av tiden hos patienter som genomgått njur-, hjärt- eller levertransplantation, enligt mätning med CYCLO-Trac SP Whole Blood Kit.

Dia efter operation	Njure[a] CyA (ng/mL)				Hjärta[b] CyA (ng/mL)				Fígado[c] CyA (ng/mL)			
	N	Händ.[d]	Med.	S.D.	N	Händ.[d]	Med.	S.D.	N	Händ.[d]	Med.	S.D
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Totalt antal händelser		24				13				3		

[a] Ciklosporin: 3,75 mg/kg till 5 mg/kg i.v. som så snart som möjligt ändras till 12 mg/kg fördelat på två doser dagligen, prednison 2-5 mg/kg som avtar till 20 mg/dag, metylpredniso-lon 1-2 mg/kg. Om njurfunktion saknades, sattes ciklosporin ut och OKT3 gavs med 5 mg/kg i 10 dagar.

[b] Ciklosporin sattes in dag 3 efter operationen med 5 mg/kg fördelat på två doser om dagen, prednison 15 mg dagligen som successivt minskades, dessutom vid behov azatioprin, ALG 50 mg/kg gavs en gång och fortsattes endast vid behov, OKT3 5 mg/kg i.v. i 7 dagar vid behov.

[c] Ciklosporin gavs initialt i.v.; peroral administrering påbörjades dag 5 med 4 mg/kg och fortsattes med lagom dos för att upprätthålla önskad blodhalt, prednison 15 mg dagligen som minskades successivt, azatioprin 2-2,5 mg/kg och sattes ut när trombocyttalet började sjunka, metylprednisolon 500 mg under ingreppet och 15 mg i.v. i 10 dagar, OKT3 5 mg/kg i 10 dagar.

[d] Njurtoxicitet eller avstötning.

TABELL III visar medelvärdena för ciklosporinhalten i blod och motsvarande kreatininhalter hos 18 njurtransplanterade patienter från universitetssjukhuset i Albany, New York.[32] I Albany hölls patienterna på miniminivåer av ciklosporin på 100 till 300 ng/mL.

TABLE III

Ciklosporinvärden i helblod som funktion av tiden hos 18 njurtransplanterade patienter enligt mätning med CYCLO-Trac SP Whole Blood Kit.

Vecka	Dag efter[a] operation	N[b]	Ciklosporin (ng/mL) Medel	S.D.	N	Kreatininhalter (mg/dL) Medel	S.D.	MIN	MÁX
1	0-7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8-14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15-21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22-28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29-35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36-42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43-49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50-56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57-63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64-70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71-77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78-84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85-91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92-98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99-105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106-112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113-119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[a] Patienter behandlade med ciklosporin 2-5 mg/kg (med 12 timmars intervall), azatioprin 4 mg/kg preoperativt och minskande till 0,75 - 1,0 mg/kg, och metylprednisolon givet som en 300 mg bolus och därefter justerat till 20 mg /dag i 30 dagar efter transplantationen och 10 mg/dag i 60 dagar efter transplantationen.

[b] Individuella ciklosporinbestämningar.

Resultaten från dessa studier visar att ciklosporinnivåerna i blod hölls vid de önskade värden för varje transplantationstyp som anges i transplantationsprotokollen för respektive center.

Eftersom ciklosporin kan ge olika blodnivåer hos olika patienter, måste man vid tolkning av resultaten och justering av doseringen ta hänsyn till hur lång tid som gått efter transplantationen, vilka andra läkemedel som ges och vilken relevant klinisk information som föreligger för patienten.

LÄKEMEDELSINTERAKTIONER

The following is reported by Sandoz LTD., Basle Switzerland for the drug Sandimmune® (cyclosporine):

Ciklosporin metaboliseras huvudsakligen av levern. Helblodsassayen för ciklosporin kan därför influeras av läkemedel som påverkar leverns mikrosomala enzymer, speciellt cytokrom P-450-systemet. Ämnen med känd hämmande effekt på dessa enzymer minskar levermetabolismen och ökar ciklosporinhalterna.

Bland de läkemedel som har rapporterats höja helblodskoncentrationen av ciklosporin återfinns danazol, ketoconazol, erytromycin, nikardipin, diltiazem, metyltestosteron och perorala antikonceptionsmedel. Substanser som inducerar cytokrom P-450-aktivitet ger en ökad levermetabolism och sänker ciklosporinhalterna.

Bland de läkemedel som har rapporterats sänka helblodskoncentrationen av ciklosporin återfinns rifampin, fenytoin, fenobarbital, intravenöst trimetoprim med sulfametoxazol och karbamazepin. Vid samtidig användning av ciklosporin och dessa läkemedel är det helt nödvändigt med en noggrann uppföljning av blodnivåerna av ciklosporin och lämplig dosjustering.

Det har visat sig att prednisolon-clearance är sänkt hos patienter som behandlas med ciklosporin och att helblodsnivåerna av ciklosporin, uppmätta med RIA, stiger efter administrering av en hög dos metylprednisolon.

15. SPECIFIKA PRESTANDA

15.1 Precision

Intraseriell variation (värden i ng/mL)

	Medelvärde	S.D	%C.V.	N
LÅG	46	4,9	10,7	25
MEDEL	186	6,0	3,2	25
HÖG	625	19,2	3,1	25

Resultat för interseriell variation från en multicenter färdighetsstudie med helblodsprov.

	Medelvärde ciklosporin (ng/mL)	S.D	%C.V.	N
Center 1*	91 203 543	15,0 27,9 53,7	16,5 13,7 9,9	5 5 5
Center 2	71 173 466	6,7 12,9 41,5	9,5 7,58 8,9	5 5 5
Center 3	78 195 500	5,4 18,4 50,2	6,8 9,4 10,0	5 5 5
Center 4	87 200 505	6,9 13,5 42,5	7,9 6,8 8,4	5 5 5
Center 5	78 192 497	3,6 10,2 23,9	4,6 5,3 4,8	5 5 5

* Anger interseriell variation på ett laboratorium som just börjat köra radio-immunoassayer.

15.2 RIKTIGHET: RIKTIGHETEN FÖR ASSAYEN HAR KONTROLLERATS MED ETT LINEARITETSTEST OCH ETT UTBYTESTEST.

Linearitet (parallellitet)

Genomsnittligt utbyte för 30 olika seriespädda patientprover (koncentrationsområde 132-1716 ng/mL).

$$\% \text{ utbyte} = 100 \times \frac{\text{(spädningsfaktor x värde för utspätt prov)}}{\text{(värde för ospätt prov)}}$$

Spädning	1/2	1/4	1/8
% utbyte	96,1	93,3	95,9
S.D.	13,7	19,2	22,6
(% C.V.)	14,3	20,6	23,6

Noggrannhet

Utbytesstudie: Genomsnittliga utbyten för 3 ciklosporinnivåer tillsatta till 5 prov, 6 kopior av varje prov (n=30).

	Tillsatt ciklosporin (ng/mL)	% utbyte	S.D.	% C.V
Nivå 1	95	119	17	14
Nivå 2	212	109	11	10
Nivå 3	467	97	7	7

15.3 Analytisk känslighet (detektionsgränser)

Medelkänsligheten för CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay, definierad som den synbarliga koncentrationen vid 3 standardavvikelser från CPM-värdena vid maximal bindning, är 8,7 ng/mL (n=20).

15.4 Analytisk specificitet

Genomsnittlig korsreaktivitet med ciklosporinmetaboliter för CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay. Korsreaktiviteten definieras som:

$$100 \times \frac{\text{(Ciklosporinkoncentration vid 50 \% } B/B_0\text{)}}{\text{(Metabolitkoncentration vid 50 \% } B/B_0\text{)}}$$

Ciklosporinmetabolit	**% korsreaktivitet**
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Interferens

Följande ämnen tillsattes till portioner av en helblodspool som innehöll ciklosporin (160-250 ng/mL). Ingen av dessa substanser uppvisade någon interferens med ciklosporinbestämningen när de förekom i nedan angivna koncentrationer.

Ämne	**Koncentration**
Kolesterol	100-1000 mg/dL
Triglycerider	300-1000 mg/dL
Bilirubin	5-30 mg/dL
Azatioprin	50-200 ng/mL
Cimetidin	500-1000 ng/mL
Nifedipin	100-200 ng/mL
6-metylprednisolon	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

De samtidigt administrerade läkemedlen i nedanstående lista har testats i halter upp till 100 µg/mL och ej visat någon interferens med assayen:

Acetaminofen	Lidokain
N-acetylprokainamid	Metoklopramid
Cefalosporin	Naficillin
Kloramfenikol	Penicillin
Digoxin	Propranolol
Disopyramid	Rifampin
Etosuximid	Salicylsyra
Gentamycinsulfat	Tobramycin
Kanamycin	Verapamil

Jämförelse mellan DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay och HPLC

Studie	Transplantattyp	Linjens ekvation	Regressions koefficient	n
Farmakokinetisk	Ej tillämpligt	Y = 0,9121X + 47	r = 0,9719	373
Universidade da Pensilvânia	Njure Hjärta Lever	Y = 0,8022X + 34 Y = 0,9196X + 50 Y = 0,9572X + 48	r = 0,9585 r = 0,9223 r = 0,9067	82 42 40
Centro Médico de Albany	Njure	Y = 1,038X + 27	r = 0,9124	187
University of Western Ontario	Njure Hjärta Lever	Y = 1,3074X + 29 Y = 1,4672X + 16 Y = 1,3575X - 12	r = 0,9703 r = 0,9696 r = 0,9067	73 75 63

Presenterade korrelationsdata utgör resultatet av studier som utförts i ett antal laboratorier med HPLC-rutiner som validerats oberoende av varandra. Ingen jämförelse bör göras med dessa data, och en eventuell jämförelse av metoder bör göras först sedan man åstadkommit en omsorgsfull standardisering av metoderna.

SE SISTA SIDAN FÖR REFERENSER

CYCLO-TRAC® SP-WHOLE BLOOD ^{125}I RIA KÉSZLET

1. FELHASZNÁLÁSI TERÜLET

KIZÁRÓLAG IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA.

A CYCLO-Trac® SP Whole Blood radioimmunoassay (RIA) készletet a ciklosporin (Ciklosporin A, Ciklosporin, Sandimmune®) teljes vérből történő kvantitatív meghatározására szánták, szív-, máj-, vese-transzplantált betegek ciklosporin kezelés befogadásának ellenőrzésére.

FIGYELEM: U.S. ÁLLAMI TÖRVÉNYEK KORLÁTOZZÁK AZ ELADÁST, FORGALMAZÁST, VALAMINT RENDELETBEN SZABÁLYOZOTT AZ ORVOSOK ÉS A KLINIKAI LABORATÓRIUMOK SZÁMÁRA A CYCLO-TRAC SP KÉSZLET HASZNÁLATA KIZÁRÓLAG CIKLOSPORIN MÉRÉSÉHEZ.

2. A TESZT ÁTTEKINTÉSE ÉS MAGYARÁZATA

A ciklosporin (Cyclosporin A, Cyclosporin, Ciclosporin, Sandimmune) egy gomba eredetű ciklikus undekapeptidis, amelynek erőteljes immunszupresszív hatása van.[1, 2] Bár a hatásmechanizmusa még vizsgálat alatt áll, úgy tűnik hatással van mind a T-helper, mind a T-szupresszor lymphocyták metabolizmusára, mellyel károsítja az immunrendszert..[3-5]

Bár ennek a gyógyszernek haszna van az újonnan transzplantált szervek kilökődésének gátlásában[6-9], számos kedvezőtlen hatásban van szerepe,[10,11] a legsúlyosabb, amikor vese-, vagy máj totoxicitás társul a gyógyszer magas vér szintjével.[12-16] Ehhez járul még hozzá, hogy a ciklosporin abszorpciója és metabolizmusa nagy variabilitást mutat beteg és beteg között.[17-19] Így a dózist egyénileg kell meghatározni és monitorozni az optimális immunszupresszió eléréséhez és a káros hatások minimalizálásához.[18,19] A teljes vérben csaknem a ciklosporin tejes mennyisége vörösvértestekhez és plazma proteinekhez kötődik.[20-22] Ez az eloszlás hatással van a hőmérséklet változásra és a hematokritra.[21,22] Az összevethető eredmények elérése érdekében a vérvétel standardizációja elengedhetetlen.[19]

Jelenleg két féle módszer létezik a betegek ciklosporin szintjének monitorozására: nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) és radioimmunoassay (RIA). Az első generációs RIA-k poliklonális antitesteket használtak, melyek nagymértékben mutattak keresztrakciót a vérben keringő metabolitokkal.[23] Ezen RIA-kal mért ciklosporin értékek mindig a HPLC érték felett voltak.[24] A második generációs RIA készletek monoklonális antitest technikán alapulnak.[25] Mind specifikus, mind non-specifikus antitestek kifejlesztésre kerültek. A specifikus antitesttel történő mérés, mely kizárólag a ciklosporin tartalmat határozza meg, a HPLC-vel megegyező értéket ad. A nem specifikus antitestekkel történő mérés, mely mind a valódi, mind a metabolit tartalmat méri, az első generációs RIA-kal megegyező eredményt ad.[26]

3. MEGHATÁROZÁS ELVE

A DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood RIA egy specifikus monoklonális antitestet használ, mely csak a cyclosporin-t méri és nem szignifikáns a keresztreakciója a metabolitokkal. A kalibrátorok, kontollok és minták metanolos extrakciója elengedhetetlen a mérés megkezdése előtt. Az assay egy inkubációs lépést és antitest fázisos szeparációs technikát alkalmaz. A mérés egyszerűsítése érdekében az első antitest (monoklonális egér Cyclosporin A antitest), és a másodlagos (szamár anti-egér) kevert hordozóban (normál egér szérum) egy reagensben került kiszerelésre, a Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep-ban.

A készlettel történő ciklosporin szint meghatározásban a teljes vér minták, kalibrátorok, kontrollok elsőként metanollal kerülnek extrahálásra. A metanolos extraktumok utána összemérésre kerülnek I-125-tel jelölt ciklosporin tracer-rel és az Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep-al. 1 óra inkubáció következik, majd a csövek centrifugálása, leöntése és mérése. A gyöngyökön visszamaradt mérhető radioaktivitás fordítottan arányos a minták ciklosporin koncentrációjával.

4. A KÉSZLET TARTALMA

CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (KÉK)	1 üveg/9 mL
CYCLO-Trac SP Kalibrátorok (0-6)	1 üveg/2 mL, 5 üveg/1 mL
CYCLO-Trac SP ImmunoSep	2 üveg/100 mL
CYCLO-Trac SP Tracer (PIROS)	1 üveg/20 mL
CYCLO-Trac SP Kontrollok	2 üveg/1 mL
Meghatározások száma	200

TÁROLÁS: A címkán jelzettek alapján, a készlet 2-8°C-on tárolandó. Felnyitást követően, valamennyi reagenst a címkén jelzett lejárati ideig 2-8°C-on kell tartani. A reagensek nem használhatók fel a lejárati időt követően. A készlet külső csomagolásán feltüntetett lejárati idő a tracer lejárati idejével egyezik meg.

A különböző gyártású készletek reagenseit szigorúan tilos összekeverni.

4.1 CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (kék): felhasználásra kész reagens
Szamár anti-egér szérum/ normál egér szérum keveréke foszfát-pufferes fiziológiás sóoldatban, mely 0,08% Na-azidot és tartósítókat tartalmaz. Kék színezéket tartalmaz. **Használat előtt alaposan rázza fel.**

4.2 CYCLO-Trac SP Kalibrátorok (0-6): felhasználásra kész reagens

Cyclosporine-mentes szérum, tartalmaz 0.1% Na azid-ot tartósítóként. Hat ciklosporin kalibrátor a 0-1200 ng/mL névleges koncentráció tartományban, humán szérumban, 0,1% Na-azidot és felületaktív anyagot tartalmaz. A megfelelő koncentráció lot-számonként változik és az üveg címkéjén kerül feltüntetésre. A DiaSorin CYCLO-Trac SP kalibrátor hitelesítése USP Cyclosporin Referencia Standard-dal történt. Valamennyi összehasonlítás más termékkel, vagy metodikával referencia standardok használatával végezhető. A készlet kalibrátorai bizonyítottan helyettesíthetőek páciens mintákkal a készlet reagenseinek és az in vitro diagnosztikai procedúra betartásával.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: felhasználásra kész reagens
Monoklonális egér anti-ciklosporin antitest és szamár anti-egér/normál egér szérum keveréke foszfát-pufferes fiziológiás sóoldatban, mely 0,08% Na-azidot és tartósítókat tartalmaz. **Használat előtt alaposan rázza fel.**

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (piros): felhasználásra kész reagens
I-125-tel jelzett ciklosporin származék és hígító citrát-EDTA puffer-ben, mely 0.05% Na-azid-ot, humán szérumot és tartósítót tartalmaz. Piros festéket tartalmaz.

4.5 CYCLO-Trac SP Kontrollok (szint 1 és szint 2): felhasználásra kész reagens
Humán szérumhoz adott meghatározott mennyiségű ciklosporin A-t tartalmaz, hogy koncentrációja a specifikus tartományba essen. A Lot-ra jellemző kontroll tartomány az üvegen van feltüntetve valamennyi készletben. 0.1% Na azid-ot és egyéb stabilizátort tartalmaz.

5. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉS

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA!
Emberek, állatok in vívó kezelése tilos.

HUMÁN EREDETŰ ANYAGOKAT TARTALMAZÓ REAGENSEK

Potenciális infektológiai forrásként kezelendőek.

Minden szérum/plazma donor egység a U.S. FDA szabályai szerint ki lett vizsgálva és negatív eredményt adott HBsAg-re, HCV antitestre és HIV ½ antitestre nézve. Bár az ellenőrzés nagy pontossággal történik nem garantálható, hogy valamennyi fertőző tényező kimutatásra kerül. A készlet tartalmaz olyan humán eredetű anyagokat is, amelyek nem esnek tesztelés alá. Mivel nem ismert olyan metodika, amely teljes biztonsággal kizárja a hepatitis B vírus (HBV), hepatitis C vírus (HCV), Humán Immunodeficiency Vírus (HIV) vagy egyéb infektológiai ágens jelenlétét, minden humán eredetű anyagot különösen nagy óvintézkedések mellett kell a laboratóriumban kezelni a U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th., May 1999 vagy későbbi előírásainak megfelelően.

NA-AZID TARTALMÚ REAGENSEK

FIGYELMEZTETÉS: A készlet néhány reagense Na-azid-ot tartalmaz. A Na-azid ólom és réz tartalmú vízvezetékekkel reakcióba lépve robbanásveszélyes fém-azidokat képez. A hulladékot bő vízzel eressze le a felszabaduló azidok kitapadásának megakadályozására. További információkat a "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976 olvashat.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 – Belélegzése, bőrrel történő érintkezése és lenyelése káros!

R32 – Savakkal kapcsolatba lépve nagyon toxikus gázok szabadulnak fel.

S28 – Bőrrel történő érintkezését követően azonnal bő vízzel mossa le.

I-125 TARTALMÚ REAGENSEK

Ez a készlet olyan I-125 tartalmú anyagokat tartalmaz, melyek radioaktivitása nem haladja meg a 9 µCi (333 kBq) értéket. Helyes előkészítés és megfelelő laboratóriumi gyakorlat szükséges az anyagok tárolásánál, kezelésénél és a hulladékkezelésnél.

Egyetemes szabályok radioizotópok kezeléséhez:

Ezeket a radioaktív anyagokat csak orvosok, vagy állatorvosok szerezhetik be, birtokolhatják és használhatják humán és állat gyógyászatban, klinikai laboratóriumokban, vagy kórházakban kizárólag in vitro klinikai, vagy laboratóriumi tesztekben, melyek nem foglalják magukban a humán, illetve állati szervezet külső, vagy belső kezelését, arra irányuló sugárzást. Ezen termékek beszerzése, birtoklása, használata, szállítása a U.S. Nuclear Regulatory Commission szabályozása alá esik.

1. A radioaktív anyagokat körülhatárolt, speciálisan jelölt területen kell tárolni.
2. A radioaktív anyagokhoz csak arra jogosult személyek férhetnek.
3. Tilos a radioaktív anyagok szájjal történő pipettázása.
4. A radioaktív munkához kijelölt területen enni és inni tilos.
5. A területet, ahová radioaktív anyag kilöttyen fel kell törölni, majd alkáli detergenssel, vagy radioaktivitást dekontamináló oldattal kell felmosni. Az üvegedényeket alaposan ki kell öblíteni vízzel mielőtt más laboratóriumi edénnyel együtt kerülne mosásra.

A radioaktív anyagok kezelésénél a következő speciális szabályok érvényesek:

A radioaktív anyagok kezelésének, használatának, szállításának és hulladékkezelésének szabályozása saját irányítás alá esik.

FIGYELMEZTETÉS: A készlet olyan anyagokat tartalmaz, amelyet a Kaliforniai Államban rákkeltőnek minősítenek.

MEGJEGYZÉS: A csomagolás mellékletén feltüntetett radioaktivitás érték némileg eltér a dobozon és a tracer üvegcse címkéjén feltüntetett radioaktivitás értékektől. A dobozon és a traceres üveg címkéjén feltüntetett érték a kalibráció idején mért aktuális radioaktivitást mutatja, míg a csomagolás mellékleteként feltüntetett érték a készlet teoretikus radioaktivitását adja meg.

6. A KÉSZLET ROMLÁSÁT JELZŐ JELLEMZŐK

6.1 Szokatlan partikulumok megjelenése bármely reagensben.

6.2 A kalibrációs görbe helyzetének és meredekségének elérése a megszokottól.

6.3 A maximális kötés csökkenése.

6.4 Magas nem specifikus kötődés.

6.5 Gyenge reprodukálhatóság a duplikátumok között.

7. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A CYCLO-Trac SP teljes vérből történő extrakciós eljáráshoz 100 µl EDTA-s teljes vér szükséges.

MEGJEGYZÉS: Heparinos minta nem használható. [19, 27]

A TELJES VÉR GYŰJTÉSE ÉS TÁROLÁSA

A vért 5, vagy 10 mL-es vacutainer üveg csőbe kell venni. Antikoagulánsként EDTA (7.2 mg/5 mL vér) alkalmazható. A minta épségének megőrzése miatt ne használjon adalék-, vagy tartósítóanyagot. Amennyiben a mintákat nem használja fel azonnal, tárolja 2-8°C-on, vagy az alatt 7 napig. Hosszabb ideig történő tároláshoz (3 hónapig) fagyassza a mintákat -20°C-ra, vagy az alá. [28, 29]

A 4°C-on tárolt teljes vért, vagy nem azonnal feldolgozásra kerülő vért alaposan fel keverni mielőtt a CYCLO-Trac SP whole blood készlettel feldolgoznánk.

8. MEGHATÁROZÁSHOZ SZÜKSÉGES EGYÉB ANYAGOK

8.1 Rendelkezésre álló bórszilikát üvegek, 12 x 75 mm.

8.2 12 x 75 mm csőhöz használható szabályozható hőmérsékletű centrifuga.

8.3 I-125 mérésére alkalmas gammaszámláló.

8.4 Vortex.

8.5 Pipetták:

- **a.** 400 µL, 100 µL és 50 µL bemérésére alkalmas pipetták
- **b.** 1.0 mL-re, illetve 100 µL-re kalibrált ismétlő adagoló
- **8.6** Metanol (HPLC minőség)

8.7 Cap-ok extrakciós csövek számára (Tudományos Termékek No. T1226-32).

9. ASSAY MENETE

9.1 Címkézzen fel egy 12 x 75mm-es üveg csövet mindegyik kalibrátornak, kontrollnak, és az ismeretlen mintáknak.

9.2 Mérjen 400 µL metanolt (HPLC minőség) mindegyik csőbe megfelelő pipettát használva.* Fedje le a csöveket parafilmmel, ha a minták még nincsenek előkészítve.

9.3 Adjon 100 µL kalibrátort, kontrollt, és teljes vér mintát a metanolhoz megfelelő pipettát használva. *

MEGJEGYZÉS: Mindegyik mintát lassan engedje a metanolba, úgy, hogy a pipettahegyet kissé a metanol felszíne alá helyezi.

9.4 Közvetlenül a minta bemérését követően a csöveket fedje le, és keverje (vortex) 15 másodpercig.

9.5 Centrifugálja lefedett csöveket 1600 x g**-vel, 20-25 °C-on 5 percig.

9.6 Óvakodjon, nehogy a metenol extraktum elpárologjon mielőtt az assay-csőbe beméri.

9.7 Feliratozza a 12 x 75 mm-es tesztcsöveket az assay terv leírása szerint (hátsó fedlap).

9.8 Hozza a reagenseket szobahőmérsékletre (20-25°C) az assay kezdete előtt.

9.9 Mérje be a következő reagenseket:

a. Totál beütés cső
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (piros)

b. Nem-specifikus kötési csövek (NSB)
50 µL extrahált 0 kalibrátor
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (piros)
1.0 mL alaposan összekevert CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (kék)

* Változtatva, 200 µL minta extrakciója 800 µL metanollal.

** g = (1118 x 10^{-8}) (sugár cm-ben kifejezve) (rpm)^2

c. **CYCLO-Trac SP 0 kalibrátor**
50 µL extrahált CYCLO-Trac SP 0 Kalibrátor
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (piros)

d. **CYCLO-Trac SP kalibrátorok (A-E)**
50 µL extrahált CYCLO-Trac kalibrátor
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (piros)

e. **Kontroll és ismeretlen minták**
50 µL extrahált minta
100 µL ^{125}I CYCLO-Trac SP (piros)

9.10 Rázza fel erőteljesen az Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep tartalmát, mérjen be azonnal 1.0 mL-t a jól felkevert reagensből valamennyi csőbe, kivéve a totál és NSB csöveket.

9.11 Vortexelje a csöveket alaposan és inkubálja 1 órán keresztül 20-25°C-on.

9.12 Centrifugálja a csöveket 1600 x g*-on, 20-25°C-on, 20 percig.

9.13 Távolítsa el a felülúszót valamennyi csőből- kivéve a totált- maximum 2 perc lefordítással. Itassa le a felülúszó cseppeket a cső szájáról itatóspapírral, mielőtt felfordítaná azokat.

9.14 Használjon gamma számlálót és mérje valamennyi csőben lévő precipitátumot és a totál csövet elegendő ideig a statisztikai pontosság eléréséhez (lsd. Az eljárás korlátai).

10. MÓDSZER KOMMENTÁR

10.1 Szabályosan, a maximális pontosság és precízió eléréséhez a metanol extrakciós lépést figyelmesen kell végrehajtani, kalibrált pipetta szüksége, mind a minta, mind a metanol beméréséhez. Ilyen pipetta szükséges az 50 µL metanol extraktum csövekbe történő beméréséhez is.

10.2 Mérje valamennyi reagens aliqot-ot a cső alsó harmadába, a minták megfelelő keveredésének elősegítéséhez.

10.3 Néhány gyártó egyszerhasználatos csöveket biztosít a nem specifikus kötések elkerülésére.

10.4 Az ImmunoSep reagenseket közvetlenül használat előtt alaposan össze kell keverni.

10.5 Ha a minta értéke magasabb, mint a legnagyobb kalibrátor, ismételje meg az extrakciót, úgy, hogy a minta: metanol arány legyen nagyobb, mint 1:4 (1:9 vagy 1:19 ajánlott). Korrigálja az eredményeket a megfelelő faktorral.

10.6 Ha a csöveket nem tudja a centrifugálást követő 5 percen belül leönteni, ajánlott a csöveket újra lecentrifugálni

10.7 Az assay indítását közvetlenül az extrakciós lépést követően kell elvégezni.

11. MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

Valamennyi laboratórium számára ajánlott legalább két kontroll mérése valamennyi futtatásnál, megfelelően validálható eredmények biztosításához. Ha ismeretlen kontrollt használ, melynek nincs meghatározott átlaga és standard devianciája, akkor ezen kontroll átlagát és standard devianciáját legalább 10 különböző futtatásból származó mérés alapján kell meghatározni. Az elfogadhatósági tartomány az előbbi mérésekből a ± 2 SD alapján kell meghatározni. A DiaSorin Quality Control Laboratory meghatározta a készletben található kontrollok tartományait. Ezek a tartományok az üvegen kerülnek feltüntetésre. Nem ajánlott a ^{125}I CYCLO-Trac SP tracer-ek egymással történő helyettesítése.

A teljes monitorozás szabályainak megfelelően a RIA assay-nél, a laboratóriumnak ellenőriznie kell az addicionális faktort. DiaSorin azt javasolja, hogy a következő paramétereket minden assay futtatás előtt ellenőrizze.

a. Totál beütésszám

* g = (1118 x 10^{-8}) (sugár cm-ben kifejezve) $(\text{rpm})^2$

b. Maximumkötődés

A Kalibrátor 0 beütés per perc-ben (CPM) kifejezett értéke/ a Totál beütés csövek átlagos CPM értéke.

c. Nem-specifikus kötődés

Az NSB csövek CPM értéke/CPM of NSB cső/ a Totál beütés csövek átlagos CPM értéke.

d. A kalibrációs görbe meredeksége

Például, figyelje meg a 80, 50 és 20%-os kalibrációs pontok vonalának futtatások közötti reprodukálhatóságát.

12. EREDMÉNYEK KALKULÁCIÓJA

Számos módszer létezik a RIA mérések értékelésre. Valamennyi az ismert kalibrátorok koncentrációja és a mért értékek közötti összefüggésen alapul. A CYCLO-Trac SP assay kalibrációjánál a B/B_0 %- log koncentráció összefüggés használandó.

12.1 Számítsa ki az átlag CPM értéket valamennyi kalibrátorra, kontrollra és beteg mintára.

12.2 Vonja ki a megfelelő CPM értékekből az átlag NSB CPM értékeket.

12.4 Ossza el a kalibrátorokra, kontrollokra és mintákra mért CPM értékeket a Kalibrátor 0-ra kapott CPM-ek átlagával.

$$B/B_0\ \% = \frac{\text{Kalibrátor, páciens minta CPM értéke – NSB CPM értéke}}{\text{Kalibrátor 0 CPM értéke – NSB CPM értéke}} \times 100$$

12.4 Használjon szemi-log papírt, ábrázolja a kalibrátorok B/B_0 %-át (Y-tengely) a hozzá tartozó koncentráció érték függvényében (X-tengely).

12.5 Ábrázolja a legjobban illeszkedő görbét.

12.6 Határozza meg a minták ciklosporin koncentrációját a görbe alapján interpolációval.

A gyakorlatban a legtöbb laboratórium számítógépes kiértékelő programot használ. A DiaSorin spline, vagy 4-paraméteres logisztikai (4PL) görbe illesztő programot használ.

MEGJEGYZÉS: NE HASZNÁLJON koncentráció scale-t (X-tengely) vagy logit B/B_0 scale-t
(Y-tengely).

ADATOK ÁTSZÁMÍTÁSA

A DiaSorin QC laboratórium simított spline görbe illesztést használ.

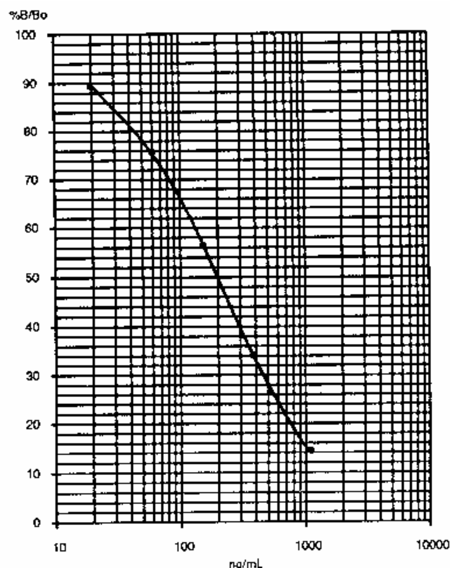
TABLÁZAT I

DiaSorin CYCLO-Trac SP teljes vér minta adatok

Cső	Duplikátum CPM	Átlag CPM	Korrigált CPM	Kötési százalék (B/T)	Százalék (B/B_0)	Konc. (ng/mL)
Totál beütésszám	51045	50892				
	50738					
NSB	1221	1328		2.6		
	1434					
0 Kalibrátor	25323	25432	24104	50.0		
	25541					
Kalibrátorok (ng/mL)						
A (20)	22781	22806	21478		89.1	
	22830					
B (61)	19850	19624	18296		75.9	
	19397					
C (154)	14843	14911	13583		56.4	
	14978					
D (379)	9506	9570	8242		34.2	
	9633					
E (1099)	4893	4858	3530		14.6	
	4823					
Ismeretlen minták						
1	16225	16122	14794		61.4	126
	16019					
2	9764	9570	8242		34.2	379
	9375					

Egy tipikus minta adatsor és kalibrációs görbe látható az I. TÁBLÁZATBAN és az 1. ÁBRÁN; ezek az értékek csak példák, ezért ne használja az eredmények kalkulációjához.

CYCLO-Trac® SP TELJES VÉR MINTA KALIBRÁCIÓS GÖRBE



ÁBRA 1

13. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

13.1 A mintákat nem szabad ismételten fagyasztani, olvasztani.

13.2 A kiválasztott mérési idő legyen elegendő a statisztikai hibák kiküszöböléséhez.

13.3 Monoklonális antitestek, mint az OKT3 nem okoz interferenciát az assay-ben.

14. VÁRT ÉRTÉKEK

A vese-, szív- és máj transzplantáltak terápiás ciklosporin szintje vérben nem meghatározott. Ez részben a változó transzplantált kezelési protokollnak köszönhető; a metodika alkalmas a ciklosporin és a vele együtt adott egyéb immunszupresszív gyógyszerek mérésére.[19, 30, 31]

A klinikai értékelésben a londoni, ontarioi, albany-i és a new york-i Egyetemi Kórház CYCLO-Trac SP Whole Blood készletet használt vese-, szív- és máj transzplantált betegeknél. Ezek a vizsgálatok a ciklosporin transzplantált betegek vérében mérhető értékét vizsgálták az idő függvényében. Transzplantációt követően a vérszint 4-90 napig került vizsgálatra vese (n = 10), szív (n = 10), és máj (n = 10) transzplantált betegekben a londoni és az ontarioi Egyetemi Kórházban. További vese transzplantáltak vizsgálatára került sor (n = 18) az albany-i, new york-i Egyetemi Kórházban a transzplantációtól a transzplantációt követő 199. napig.

TÁBLÁZAT II mutatja az átlag ciklosporin vér koncentrációt és a szignifikáns változásokat (kiürülés, vagy nefrotoxicitás) a londoni, ontarioi Egyetemi Kórház eredményei alapján. Ebben a központban 400 - 650 ng/mL ciklosporin vérkoncentrációjú páciens mintákat vizsgáltak a transzplantáció típusának és a klinikai képek függvényében.

TÁBLÁZAT II

A ciklosporin időbeni változása teljes vérben vese-, szív- és máj transzplantált betegekben CYCLO-Trac SP Whole Blood készlettel mérve.

Post Operatív nap	Vese[a] CyA (ng/mL)				Szív[b] CyA (ng/mL)				Máj[c] CyA (ng/mL)			
	N	eset[d]	átlag	S.D.	N	eset[d]	átlag	S.D.	N	eset[d]	átlag	S.D.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Összes eset		24				13				3		

[a] Ciklosporin: 3.75 mg/kg - 5 mg/kg I.V. változtatás 12 mg/kg-ra kettéválasztva amilyen hamar csak lehet, prednison 2-5 mg/kg-ról csökkentve 20 mg/napra, methylprednisolon 1-2 mg/kg. Ha nincs vese funkció a ciklosporin adagolás megszakítva és OKT3 adása 5 mg/kg 10 napig.

[b] Ciklosporin adása az operáció utáni 3. napon kezdődik 5 mg/kg-mal két adagban, prednison napi 15 mg fokozatosan csökkentve, azathioprin adása indokolt esetben, ALG 50 mg/kg adása egyszer, kizárólag indokolt esetben, OKT3 5 mg/kg I.V. 7 napig, ha szükséges.

[c] Ciklosporin adása I.V. kezdetben orális adagolás az 5. naptól 4 mg/kg-mal a kívánt vér szint fenntartásával, prednison napi 15 mg fokozatosan csökkentve, azathioprin 2-2.5 mg/kg és megszakítása a vérlemezkék számának csökkenésével, metil-prednisolon 500 mg intraoperativ és 15 mg I.V. for 10 napig, OKT3 5 mg/kg 10 napig.

[d] Nefrotoxicitás, vagy kilökődés.

TÁBLÁZAT III mutatja az átlagos vér ciklosporin és a hozzá tartozó kreatinin szinteket 18 vese transzplantált beteg adatai alapján az albany-i és a new york-i Egyetemi Kórház mérései alapján.[32] Az albany-i páciensek ciklosporin szintje 100-300 ng/mL között volt tartva.

TÁBLÁZAT III

18 vese transzplantált beteg teljes vér ciklosporin szintjének időbeni változása CYCLO-Trac SP Whole Blood készlettel mérve.

Hét	Operáció után[a] nap	Ciklosporin (ng/mL) N[b]	Átlag	S.D.	Kreatinin szint (mg/dL) N	Átlag	S.D.	MIN	MAX
1	0-7	12	151	128	143	4.9	4.0	0.7	18.0
2	8-14	16	185	96	125	2.7	2.2	1.1	8.2
3	15-21	19	173	94	94	2.7	1.9	1.1	9.4
4	22-28	17	198	146	76	3.0	1.9	1.1	8.5
5	29-35	22	210	168	70	2.9	1.7	1.2	8.2
6	36-42	17	164	63	68	2.5	1.1	1.1	5.6
7	43-49	14	175	53	55	2.4	1.1	1.1	5.4
8	50-56	17	198	99	42	2.1	1.0	1.2	5.4
9	57-63	16	176	54	40	3.1	2.7	1.0	10.9
10	64-70	4	199	59	34	3.5	3.3	0.9	11.7
11	71-77	18	146	73	27	3.0	3.1	0.9	11.1
12	78-84	5	142	76	18	3.5	3.3	1.1	11.2
13	85-91	1	304	-	7	4.2	0.3	3.6	4.6
14	92-98	1	317	-	10	3.4	1.1	1.7	4.8
15	99-105	2	121	10	9	4.1	1.6	2.0	5.5
16	106-112	1	49	-	5	5.4	2.5	1.7	8.7
17	113-119	1	79	-	3	1.6	0.1	1.6	1.7

[a] A pácienseket 2-5 mg/kg ciklosporinnal kezelték (12 órás intervallumban), azathioprin-nel
4 mg/kg preoperativ és csökkentették 0.75 - 1.0 mg/kg-ig, metilprednisolon 300 mg-os bolus-ban került beadásra, majd beállították 20 mg/nap-ra 30 napig, vagy 10 mg/nap-ra 60 napig az operációt követően.

[b] Egyéni ciklosporin meghatározás.

A tanulmány eredménye rámutat, hogy a vér ciklosporin szint valamennyi transzplantáció típusnál a kívánt szinten tartható valamennyi transzplantációs centrum visszajelzése alapján.

Mivel a vér ciklosporin szintje különböző betegekben nagyon eltérő lehet, ezért az eredményközlésnél és a dózis beállításnál figyelembe kell venni az operáció utáni periódust, más alkalmazott gyógykezelést és valamennyi, a betegre vonatkozó egyéb klinikai információt.

GYÓGYSZER KÖLCSÖNHATÁS

A következő jelentés a Sandoz LTD., Basle Svájc-tól a Sandimmune-ra vonatkozóan® (cyclosporin):

A cyclosporin-t nagymértékben a máj metabolizálja. Ezért a teljes vérben mérhető szintet nagymértékben befolyásolják azok a gyógyszerek, melyek hatással vannak a máj mikroszómális enzimeire, különösen a citokrom P-450 rendszerre. Lényeges ismerni ezen enzimekre gyakorolt gátló hatásukat, amely során lecsökken a máj metabolizmusa és megemelkedik a ciklosporin szint a teljes vérben. A gyógyszerek, amelyek megemelik a teljes vér ciklosporin koncentrációját danazol-t, ketoconazol-t, erythromycin-t, nicardipin-t, diltiazem-et, methyltestosteron-t tartalmaznak, illetve ilyen hatást fejtenek ki a fogamzásgátló szerek. Azok az anyagok, amelyek indukálják a citokrom P-450 aktivitást, megemelik a máj metabolizmust és lecsökkentik a teljes vér ciklosporin szintjét.

A gyógyszerek, melyek lecsökkentik a teljes vér ciklosporin koncentrációját rifampin-t, phenytoin-t, phenobarbital-t, I.V. trimethoprim-ot sulfa-methoxazol-lal, vagy carbamazepine-t tartalmaznak. A vér ciklosporin szintjének monitorozása és a megfelelő adagolás beállítása létfontosságú ezen gyógyszerek használatakor.

Megfigyelhető, hogy a prednisolon clearance csökken a ciklosporinnal kezelt betegeknél és a teljes vér ciklosporin szintje RIA-val mérve megemelkedik nagy dózisú methylprednisolon kezelés hatására.

15. SPECIFIKUS TELJESÍTŐKÉPESSÉG JELLEMZŐK

15.1 Precízió

Intra-assay (érték = ng/mL)

	Átlag érték	S.D.	%C.V.	N
ALACSONY	46	4.9	10.7	25
KÖZÉP	186	6.0	3.2	25
MAGAS	625	19.2	3.1	25

Inter-assay eredmények multi-központ tanulmány alapján teljes vérből.

	Átlag Ciklosporin (ng/mL)	S.D.	%C.V.	N
Központ 1*	91	15.0	16.5	5
	203	27.9	13.7	5
	543	53.7	9.9	5
Központ 2	71	6.7	9.5	5
	173	12.9	7.58	5
	466	41.5	8.9	5
Központ 3	78	5.4	6.8	5
	195	18.4	9.4	5
	500	50.2	10.0	5
Központ 4	87	6.9	7.9	5
	200	13.5	6.8	5
	505	42.5	8.4	5
Központ 5	78	3.6	4.6	5
	192	10.2	5.3	5
	497	23.9	4.8	5

* Ajánlott az assay-k közötti variáció vizsgálata, mielőtt radio-immunoassay mérésébe kezd.

15.2 HELYESSÉG: AZ ASSAY HELYESSÉGE LINAEARITÁSI ÉS VISSZANYERÉSI TESZTTEL ELLENŐRIZHETŐ.

Linearitás (Parallelizmus)

Átlagos visszanyerés 30 különböző minta hígításából (koncentráció tartomány 132-1716 ng/mL).

$$\% \text{ Visszanyerés} = 100 \times \frac{(\text{hígítási faktor x hígított minta értéke})}{(\text{hígítatlan minta értéke})}$$

Hígítás	1/2	1/4	1/8
% Visszanyerés	96.1	93.3	95.9
S.D.	13.7	19.2	22.6
% C.V.	14.3	20.6	23.6

Pontosság

Visszanyerési vizsgálat: átlagos visszanyerés 5 mintához 3 mennyiségben történő ciklosporin hozzáadással, valamennyiből 6 replikátummal (n=30).

	Hozzáadott ciklosporin (ng/mL)	% Visszanyerés	S.D.	% C.V
Szint 1	95	119	17	14
Szint 2	212	109	11	10
Szint 3	467	97	7	7

15.3 Analitikai Szenzitivitás (detektálási határ)

Meghatározható, mint az a koncentráció érték, amelynek beütésszáma három standard devianciával eltér a maximum kötés értékétől, a CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay átlagos szenzitivitása 8.7 ng/mL (n=20).

15.4 Analitikai Specificitás

Ciklosporin metabolitok keresztreakciója CYCLO-Trac SP Whole Blood assay-vel. Keresztreakció definíciója:

$$100 \times \frac{(\text{Ciklosporin koncentráció 50\%-os } B/B_{0\text{-nál}})}{(\text{Metabolit koncentráció 50\%-os } B/B_{0\text{-nál}})}$$

Ciklosporin metabolit	**Keresztreakció %**
1	1.7
8	<0.1
13	0.1
17	0.7
18	0.2
21	0.8

15.5 Interferenciák

A következő anyagok kerültek hozzáadásra ciklosporin tartalmú (160-250 ng/mL) teljes vér pool-ok aliqotjaihoz. Egyik sem okozott interferenciát ciklosporin mérésekor az alább látható koncentrációkban.

Anyag	**Koncentráció**
Koleszterol	100-1000 mg/dL
Triglicerid	300-1000 mg/dL
Bilirubin	5-30 mg/dL
Azathioprine	50-200 ng/mL
Cimetidin	500-1000 ng/mL
Nifedipin	100-200 ng/mL
6-metil-prednisolon	20-60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

A következő listán található gyógyszereket 100 μg/mL koncentrációval vizsgáltál és nem találtak interferációs hatást az assay-vel:

Acetaminophen	Lidocaine
N-Acetylprocainamide	Metoclopramide
Cephalosporine	Naficillin
Chloramphenicol	Penicillin
Digoxin	Propranolol
Disopyramide	Rifampin
Ethosuximide	Salicylic Acid
Gentamycin Sulfate	Tobramycin
Kanamycin	Verapamil

DiaSorin CYCLO-Trac SP Whole Blood Assay összehasonlítása HPLC-vel.

Tanulmány	Transzplantáció típusa	Lineáris egyenlet	Regressziós koefficiens	n
Farmakokinetika	N/A	Y = 0.9121X + 47	r = 0.9719	373
Pennsylvania-I Egyetem	Vese Szív Máj	Y = 0.8022X + 34 Y = 0.9196X + 50 Y = 0.9572X + 48	r = 0.9585 r = 0.9223 r = 0.9067	82 42 40
Albany Medical Center	Vese	Y = 1.038X + 27	r = 0.9124	187
Western Ontario Egyetem	Vese Szív Máj	Y = 1.3074X + 29 Y = 1.4672X + 16 Y = 1.3575X - 12	r = 0.9703 r = 0.9696 r = 0.9067	73 75 63

Az itt közétett adatok számos olyan laboratórium tanulmányaiból származnak, akik önállóan érvényesített HPLC metodikát használnak. Az adatok nem hasnlíthatóak össze és minden módszer összehasonlítás csak alapos standardizáció után lehetséges.

Irodalmak az utolsó oldalon

KIT RIA ^{125}I ΓΙΑ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ CYCLO-TRAC® SP

1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Το κιτ ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA) για ολικό αίμα CYCLO-Trac® SP προορίζεται για την ποσοτική μέτρηση της κυκλοσπορίνης (κυκλοσπορίνη Α, κυκλοσπορίνη, Sandimmune®) σε ολικό αίμα ως βοήθημα στη διαχείριση των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση καρδιάς, νεφρού ή ήπατος και λαμβάνουν κυκλοσπορίνη.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Ο ΟΜΟΣΠΟΝΔΙΑΚΟΣ ΝΟΜΟΣ ΠΕΡΙΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΠΩΛΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΑΠΟ ΙΑΤΡΟ, Ή ΚΑΤΟΠΙΝ ΕΝΤΟΛΗΣ ΑΥΤΟΥ, Ή ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ. Η ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΙΑΤΡΟ, ΑΠΟ ΙΑΤΡΟ Ή ΚΑΤΟΠΙΝ ΕΝΤΟΛΗΣ ΙΑΤΡΟΥ. ΤΟ ΚΙΤ RIA CYCLO-TRAC SP ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟ ΜΕ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η κυκλοσπορίνη (κυκλοσπορίνη Α, κυκλοσπορίνη, Sandimmune) είναι ένα κυκλικό εντεκαπεπτίδιο με μυκητιακή προέλευση και ισχυρές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες.[1,2] Αν και ο μηχανισμός δράσης της βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα, η κυκλοσπορίνη φαίνεται να επηρεάζει το μεταβολισμό τόσο των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων όσο και των κατασταλτικών Τ λεμφοκυττάρων, γεγονός που διαταράσσει το ανοσοποιητικό σύστημα.[3-5]

Αν και αυτό το φάρμακο έχει αποδειχτεί ωφέλιμο στην πρόληψη της απόρριψης μεταμοσχεύσεων νέων οργάνων,[6-9] έχουν αναφερθεί πολυάριθμες ανεπιθύμητες ενέργειες,[10,11] εκ των οποίων η πιο σοβαρή είναι η τοξικότητα των νεφρών και του ήπατος που συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του φαρμάκου αυτού στο αίμα[12-16]. Επιπλέον, η απορρόφηση και ο μεταβολισμός της κυκλοσπορίνης διαφέρει σημαντικά μεταξύ ασθενών.[17-19] Επομένως, η δοσολογία πρέπει να εξατομικευτεί και να παρακολουθείται προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη ανοσοκαταστολή και να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση ανεπιθύμητων αντιδράσεων.[18,19] Σχεδόν όλη η κυκλοσπορίνη που υπάρχει στο ολικό αίμα είναι δεσμευμένη στα ερυθρά αιμοσφαίρια και τις πρωτεΐνες πλάσματος.[20-22] Η διανομή επηρεάζεται από αλλαγές στη θερμοκρασία και τον αιματοκρίτη.[21,22] Προκειμένου να εξασφαλιστούν συνεπή αποτελέσματα, απαιτείται ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο για την αιμοληψία.[19]

Σήμερα, διατίθενται δύο μέθοδοι για την παρακολούθηση των επιπέδων κυκλοσπορίνης σε ασθενείς: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και ραδιο-ανοσοπροσδιορισμός (RIA). Οι RIA πρώτης γενεάς χρησιμοποιούσαν πολυκλωνικά αντισώματα που εμφανίζουν υψηλή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τους μεταβολίτες που κυκλοφορούν.[23] Οι τιμές κυκλοσπορίνης που προκύπτουν από αυτούς τους RIA υπερβαίνουν σταθερά αυτές που προκύπτουν από υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).[24] Οι RIA δεύτερης γενεάς βασίζονται σε τεχνολογία μονοκλωνικών αντισωμάτων.[25] Έχουν αναπτυχθεί τόσο ειδικά όσο και μη ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα. Το ειδικό αντίσωμα μετράει μόνο τη γονική ένωση της κυκλοσπορίνης και παράγει τιμές όμοιες με αυτές που λαμβάνονται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Το μη ειδικό αντίσωμα μετράει τη γονική ένωση και τους μεταβολίτες και επιφέρει αποτελέσματα όμοια με αυτά των ραδιο-ανοσοπροσδιορισμών πρώτης γενεάς.[26]

3. ΑΡΧΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ο RIA για ολικό αίμα CYCLO-Trac SP της DiaSorin χρησιμοποιεί ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα που μετράει μόνο την κυκλοσπορίνη και δεν παρουσιάζει σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τους μεταβολίτες της. Για τους βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα, απαιτείται βήμα εκχύλισης με μεθανόλη πριν από τον προσδιορισμό. Ο προσδιορισμός αποτελείται από ένα μοναδικό βήμα επώασης και χρησιμοποιεί τεχνική διαχωρισμού φάσεων με διπλό αντίσωμα. Για να απλουστευθεί η διαδικασία, το πρώτο αντίσωμα (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικιού ειδικό στην κυκλοσπορίνη Α) και το δεύτερο αντίσωμα (αντι-ποντικιού από όνο) προαναμιγνύονται σε ένα φορέα (ορό ποντικιού) για να παράγουν ένα αντίσωμα που ονομάζεται Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep.

Προκειμένου να καθοριστούν τα επίπεδα κυκλοσπορίνης με το κιτ αυτό, τα δείγματα ολικού αίματος, οι βαθμονομητές και τα υλικά ελέγχου εκχυλίζονται πρώτα με μεθανόλη. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα μεθανόλης αναμιγνύονται με ιχνηθέτη κυκλοσπορίνης, επισημασμένο με ιώδιο 125, και Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Μετά από επώαση 1 ώρας, οι δοκιμαστικοί σωλήνες υφίστανται φυγοκέντρηση, μεταγγίζονται και κατόπιν μετριούνται. Η ποσότητα της ραδιενέργειας που παραμένει στο σβώλο είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση της κυκλοσπορίνης που υπάρχει στο δείγμα.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (ΚΥΑΝΟ)	1 φιαλίδιο/9 mL
Βαθμονομητές CYCLO-Trac SP (0 έως 6)	1 vial/2 mL, 5 vials/1 mL
CYCLO-Trac SP ImmunoSep	2 φιαλίδια/100 mL
Ιχνηθέτης CYCLO-Trac SP (ΕΡΥΘΡΟΣ)	1 φιαλίδιο/20 mL
Υλικά ελέγχου CYCLO-Trac SP	2 φιαλίδια/1 mL
Αριθμός δοκιμών	200

ΦΥΛΑΞΗ: Μετά την παραλαβή του, το κιτ θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C. Μετά το άνοιγμα, φυλάξτε κάθε αντιδραστήριο στους 2 έως 8°C έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε περίπτωση που παρέλθει η ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί στην ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη.

Δεν ενδείκνυται η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

4.1 NSB ImmunoSep CYCLO-Trac SP (κυανό): Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Το προαναμιγμένο διάλυμα ορού αντι-ποντικιού από όνο και ορού ποντικιού είναι αραιωμένο σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά που περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,08% και επιφανειοδραστικό μέσο. Προστίθεται κυανή χρωστική. **Ανακινήστε έντονα μόλις πριν από τη χρήση.**

4.2 Βαθμονομητές CYCLO-Trac SP (0 έως 6): Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Ο ορός χωρίς κυκλοσπορίνη περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,1% και επιφανειοδραστικό μέσο. Έξι βαθμονομητές κυκλοσπορίνης, με ονομαστικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0 έως 1200 ng/mL, προαραιώνονται σε ανθρώπινο ορό που περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,1% και επιφανειοδραστικό μέσο. Οι ακριβείς τιμές συγκέντρωσης εκχωρούνται για κάθε παρτίδα και αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων.Ο βαθμονομητής CYCLO-Trac SP της DiaSorin έχει βαθμονομηθεί σύμφωνα με το πρότυπο αναφοράς για την κυκλοσπορίνη της USP. Τυχόν σύγκριση με άλλα προϊόντα ή διαδικασίες θα πρέπει να γίνεται με αυτό το πρότυπο αναφοράς. Ο χειρισμός των βαθμονομητών μπορεί να είναι ίδιος με αυτόν των δειγμάτων ασθενών όταν χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και η λειτουργική διαδικασία της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής in vitro, όπως συνιστάται.

4.3 Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Το προαναμιγμένο διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος αντι-κυκλοσπορίνης ποντικιού και ορό αντι-ποντικιού από όνο/ορό ποντικιού είναι αραιωμένο σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά που περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,08% και επιφανειοδραστικό μέσο. **Ανακινήστε έντονα μόλις πριν από τη χρήση**.

4.4 ^{125}I CYCLO-Trac SP (ερυθρό): Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Ένα παράγωγο της κυκλοσπορίνης είναι επισημασμένο με ιώδιο 125 και αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-EDTA το οποίο περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,05%, ανθρώπινο ορό και επιφανειοδραστικό μέσο. Προστίθεται ερυθρή χρωστική.

4.5 Υλικά ελέγχου CYCLO-Trac SP (επίπεδο 1 και επίπεδο 2): Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Στον ανθρώπινο ορό προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα κυκλοσπορίνης A για να ληφθεί συγκέντρωση εντός μιας καθορισμένης περιοχής τιμών. Οι περιοχές τιμών για κάθε παρτίδα αναγράφονται στα φιαλίδια υλικών ελέγχου που περιέχονται σε κάθε κιτ. Έχουν προστεθεί αζίδιο του νατρίου 0,1% και άλλοι σταθεροποιητές.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ.
Δεν προορίζεται για εσωτερική και εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΛΙΚΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Χειριστείτε ως εάν ήταν δυνητικώς μολυσματικά.

Κάθε μονάδα δότη ορού/πλάσματος που έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία του παρόντος προϊόντος έχει δοκιμαστεί με μέθοδο εγκεκριμένη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. και βρέθηκε μη αντιδραστική ως προς την παρουσία HBsAg, αντισώματος στον ιό HCV και αντισώματος στον ιό HIV 1/2. Αν και οι μέθοδοι αυτές είναι εξαιρετικά ακριβείς, δεν εγγυώνται την ανίχνευση όλων των μολυσματικών μονάδων. Το παρόν προϊόν ενδεχομένως να περιέχει και άλλο υλικό ανθρώπινης προέλευσης για το οποίο δεν υπάρχει εγκεκριμένη δοκιμή. Επειδή καμία γνωστή μέθοδος δοκιμής δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διαβεβαίωση ότι απουσιάζουν ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, ο χειρισμός όλων των προϊόντων που περιέχουν υλικά ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με καλές εργαστηριακές πρακτικές χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις, όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 4η έκδοση, Μάιος 1999 ή την τρέχουσα έκδοση, των U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (Κέντρα για τον Έλεγχο και Πρόληψη Νόσων/Εθνικά Ιδρύματα Υγείας των Η.Π.Α.).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μερικά αντιδραστήρια στο κιτ αυτό περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, εκπλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίων. Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts», στον οδηγό διαχείρισης ασφάλειας με κωδικό CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων στην Ατλάντα της Τζόρτζια, 1976.

Φράσεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)
R20/21/22 - Βλαβερό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.
R32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.
S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 9 μCi (333 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρους που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές in vitro που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.

4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.

5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί καρκίνο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

6. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΦΘΟΡΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΙΤ

6.1 Παρουσία ασυνήθιστων στερεών σωματιδίων σε οποιοδήποτε αντιδραστήριο.

6.2 Μετατόπιση της κλίσης ή της θέσης της καμπύλης βαθμονόμησης σε σχέση με αυτήν που λαμβάνεται κανονικά.

6.3 Μείωση της μέγιστης δέσμευσης.

6.4 Υψηλή μη ειδική δέσμευση.

6.4 Πτωχή αναπαραγωγικότητα στις τιμές επαναλήψεων.

7. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για τη διαδικασία εκχύλισης ολικού αίματος του CYCLO-Trac SP, απαιτούνται εκατό μικρόλιτρα ολικό αίμα με EDTA.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα στα οποία έχει προστεθεί ηπαρίνη.[19, 27]

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Συλλέξτε αίμα με φλεβοπαρακέντηση σε κενό υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 5 ή 10 mL. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί EDTA (7,2 mg/5 mL αίμα) ως αντιπηκτικό. Δεν απαιτούνται άλλα πρόσθετα ή συντηρητικά για τη διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος. Αν τα δείγματα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, φυλάξτε τα στους 2 έως 8°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες έως 7 ημέρες. Για παρατεταμένη φύλαξη (έως 3 μήνες), καταψύξτε τα δείγματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.[28, 29]

Τα δείγματα ολικού αίματος που φυλάσσονταν στους 4°C ή που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία αμέσως, θα πρέπει να αναμιχθούν εξονυχιστικά πριν από τη δειγματοληψία για εξέταση με το κιτ ολικού αίματος CYCLO-Trac SP.

8. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ, ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

8.1 Αναλώσιμοι δοκιμαστικοί σωλήνες από βοριοπυριτικό ύαλο, 12 x 75 χλστ.

8.2 Φυγοκέντρηση με ελεγχόμενη θερμοκρασία στην οποία μπορούν να προσαρμοστούν δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 χλστ.

8.3 Μετρητής σπινθηρισμών γάμα με δυνατότητα μέτρησης ιωδίου 125.

8.4 Όργανο περιδίνησης (vortex).

8.5 Συσκευές πιπέτας:

- **α.** Πιπέτες θετικού εκτοπίσματος 400 µL, 100 µL και 50 µL.
- **β.** Διανομείς επαναλαμβανόμενης χορήγησης, βαθμονομημένοι ώστε να διανέμουν 1,0 mL και 100 µL.

8.6 Μεθανόλη (βαθμού HPLC).

8.7 Καπάκια για δοκιμαστικούς σωλήνες εκχύλισης (επιστημονικά προϊόντα με κωδικό T1226-32).

9. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

9.1 Επικολλήστε ετικέτα σε ένα υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 12 x 75 για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και άγνωστο δείγμα.

9.2 Διανέμετε 400 μL μεθανόλη (βαθμού HPLC) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με χρήση πιπέτας θετικού εκτοπίσματος.* Καλύψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με parafilm, σε περίπτωση που τα δείγματα δεν είναι ακόμη έτοιμα να προστεθούν.

9.3 Προσθέστε τους βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα ολικού αίματος στη μεθανόλη χρησιμοποιώντας πιπέτα θετικού εκτοπίσματος 100 μL.*

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Διανέμετε αργά κάθε δείγμα με τη μύτη της πιπέτας τοποθετημένη λίγο κάτω από την επιφάνεια της μεθανόλης.

9.4 Αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος, τοποθετήστε καπάκι σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και στροβιλίστε σε όργανο περιδίνησης (vortex) για 15 δευτερόλεπτα.

9.5 Φυγοκεντρήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες, αφού έχετε πρώτα τοποθετήσει καπάκια, με χρήση 1600 x g** στους 20 έως 25°C για 5 λεπτά.

9.6 Προσέξτε να μην αφήσετε τα εκχυλίσματα μεθανόλης να εξατμιστούν πριν τα τοποθετήσετε με πιπέτα στους δοκιμαστικούς σωλήνες του προσδιορισμού.

9.7 Τακτοποιήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 χλστ, στους οποίους έχει επικολληθεί ετικέτα, σύμφωνα με το σχήμα του προσδιορισμού (οπισθόφυλλο).

9.8 Αφήστε τα αντιδραστήρια να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C) πριν τα χρησιμοποιήσετε στον προσδιορισμό.

9.9 Προσθέστε τα αντιδραστήρια ως ακολούθως:

α. Δοκιμαστικοί σωλήνες συνολικών κρούσεων
100 μL ^{125}I CYCLO-Trac SP (ερυθρό)

β. Δοκιμαστικοί σωλήνες μη ειδικής δέσμευσης (NSB)
50 μL εκχυλισμένος βαθμονομητής 0
100 μL ^{125}I CYCLO-Trac SP (ερυθρό)
1,0 mL καλά αναμιγμένο CYCLO-Trac SP NSB ImmunoSep (κυανό)

γ. Βαθμονομητής 0 CYCLO-Trac SP
50 μL εκχυλισμένος βαθμονομητής 0 CYCLO-Trac SP
100 μL ^{125}I CYCLO-Trac SP (ερυθρό)

δ. Βαθμονομητές CYCLO-Trac SP (A έως E)
50 μL εκχυλισμένος βαθμονομητής CYCLO-Trac
100 μL ^{125}I CYCLO-Trac SP (ερυθρό)

ε. Υλικό ελέγχου και άγνωστα δείγματα
50 μL εκχυλισμένο δείγμα
100 μL ^{125}I CYCLO-Trac SP (ερυθρό)

9.10 Ανακινήστε δυνατά το φιαλίδιο Anti-CYCLO-Trac SP ImmunoSep. Προσθέστε αμέσως 1,0 mL καλά αναμιγμένο αντιδραστήριο σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων και NSB.

9.11 Στροβιλίστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε όργανο περιδίνησης (vortex) και επωάστε τους για 1 ώρα στους 20 έως 25°C.

9.12 Φυγοκεντρήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με χρήση 1600 x g** για 20 λεπτά στους 20 έως 25°C.

* Εναλλακτικά, μπορείτε να εκχυλίσετε 200 μL δείγμα με 800 μL μεθανόλη.

** $g = (1118 \times 10^{-8})$ (ακτίνα σε εκατοστά) $(\text{rpm})^2$

9.13 Μεταγγίστε αμέσως το υπερκείμενο υγρό από όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από αυτούς των συνολικών κρούσεων αναστρέφοντάς τους για 2 λεπτά, το μέγιστο. Στεγνώστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με στυπόχαρτο για να αφαιρέσετε τυχόν σταγόνες υπερκείμενου υγρού που ενδεχομένως να παραμένει στο χείλος των δοκιμαστικών σωλήνων πριν τους φέρετε σε όρθια θέση.

9.14 Με χρήση μετρητή σπινθηρισμών γάμα, μετρήστε το ίζημα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα και τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων για χρόνο αρκετό για την επίτευξη στατιστικής ακρίβειας (βλ. παράγραφο Περιορισμοί της διαδικασίας).

10. ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

10.1 Προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη ορθότητα και ακρίβεια, θα πρέπει να ακολουθούνται προσεχτικά τα βήματα εκχύλισης με μεθανόλη. Πρέπει να χρησιμοποιηθούν πιπέτες θετικού εκτοπίσματος (SMI) για τη διανομή τόσο της μεθανόλης όσο και των δειγμάτων. Απαιτούνται επίσης πιπέτες θετικού εκτοπίσματος για τη μεταφορά 50 μL εκχύλισμα μεθανόλης σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα του προσδιορισμού.

10.2 Προσθέστε κάθε κλάσμα αντιδραστηρίου στο χαμηλότερο τρίτο του δοκιμαστικού σωλήνα προκειμένου να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμιξη των αντιδραστηρίων.

10.3 Οι αναλώσιμοι δοκιμαστικοί σωλήνες μερικών κατασκευαστών ενδεχομένως να αποδώσουν αυξημένες μη ειδικές δεσμεύσεις ή να προκαλέσουν αυξημένη διολίσθηση σβώλου.

10.4 Τα αντιδραστήρια ImmunoSep θα πρέπει να αναμιχθούν δυνατά μόλις πριν από τη χρήση.

10.5 Αν η ένδειξη για το δείγμα είναι μεγαλύτερη από το βαθμονομητή με την υψηλότερη τιμή, εκτελέστε εκ νέου εκχύλιση με χρήση αναλογίας αίματος: μεθανόλη μεγαλύτερης από 1:4 (συνιστώνται 1:9 ή 1:19). Πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα του προσδιορισμού με τον κατάλληλο παράγοντα διόρθωσης.

10.6 Αν η μετάγγιση των δοκιμαστικών σωλήνων δεν είναι δυνατή εντός 5 λεπτών από τη διακοπή της φυγοκέντρησης, συνιστάται να εκτελέσετε εκ νέου φυγοκέντρηση των δοκιμαστικών σωλήνων.

10.7 Εκτελέστε τον προσδιορισμό αμέσως μετά το βήμα εκχύλισης.

11. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει δύο τουλάχιστον δείγματα υλικών ελέγχου με κάθε προσδιορισμό προκειμένου να εξασφαλίσει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων κάθε προσδιορισμού. Αν χρησιμοποιείτε υλικά ελέγχου που δεν έχουν προσδιοριστεί και δεν έχετε υπολογίσει τη μέση και τυπική απόκλιση, θα πρέπει να καθορίσετε τη μέση και τυπική απόκλιση για κάθε υλικό ελέγχου χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δέκα προσδιορισμούς. Μια αποδεχτή περιοχή τιμών μπορεί κατόπιν να ληφθεί για αυτά τα υλικά ελέγχου χρησιμοποιώντας ±2 τυπικές αποκλίσεις των τιμών που καθορίστηκαν προηγουμένως. Το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου της DiaSorin έχει καθορίσει μια περιοχή τιμών για τα υλικά ελέγχου που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό. Αυτές οι περιοχές τιμών αναγράφονται στα φιαλίδια των υλικών ελέγχου. Δεν συνιστάται να εναλλάσσονται τα αντιδραστήρια του κιτ, εκτός από τον ιχνηθέτη ^{125}I CYCLO-Trac SP.

Για να παρακολουθεί πλήρως ένα εργαστήριο τη συνεπή απόδοση ενός ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA), υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται. Η DiaSorin προτείνει τακτικό έλεγχο των παρακάτω παραμέτρων για να εξασφαλιστεί η συνεπής απόδοση του κιτ.

α. Συνολικές κρούσεις

β. Μέγιστη δέσμευση

Κρούσεις ανά λεπτό (CPM) δοκιμαστικού σωλήνα βαθμονομητή 0 /Μέσες CPM δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων.

γ. Μη ειδική δέσμευση
CPM δοκιμαστικού σωλήνα NSB/Μέσες CPM δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων.

δ. Κλίση καμπύλης βαθμονόμησης
Για παράδειγμα, παρατηρήστε τα σημεία 80, 50 και 20% της καμπύλης βαθμονόμησης για την αναπαραγωγικότητα μεταξύ εκτελέσεων.

12. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό αποτελεσμάτων RIA. Κάθε μία βασίζεται στη λήψη καμπύλης βαθμονόμησης με το σχεδιασμό του βαθμού δέσμευσης συναρτήσει των συγκεντρώσεων βαθμονομητών. Η καμπύλη για τον προσδιορισμό CYCLO-Trac SP λαμβάνεται με τη σχεδίαση του % B/B_0 συναρτήσει της λογαριθμημένης συγκέντρωσης.

12.1 Υπολογίστε τη μέση τιμή CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και δείγμα ασθενή.

12.2 Αφαιρέστε τις μέσες CPM των δοκιμαστικών σωλήνων NSB από όλες τις κρούσεις για να λάβετε τις διορθωμένες CPM.

12.3 Διαιρέστε το διορθωμένο CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου ή δείγμα ασθενή με το διορθωμένο CPM του βαθμονομητή 0.

$$\% \, B/B_0 = \frac{\text{CPM βαθμονομητή ή δείγματος ασθενή – CPM NSB}}{\text{CPM βαθμονομητή 0 – CPM NSB}} \times 100$$

12.4 Με χρήση χαρτιού ημιλογαριθμικού γραφήματος τριών κύκλων, σχεδιάστε το % B/B_0 των βαθμονομητών (άξονας Y) συναρτήσει των αντίστοιχων συγκεντρώσεών τους (άξονας X).

12.5 Σχεδιάστε την καμπύλη που προσαρμόζεται καλύτερα στα σημεία.

12.6 Υπολογίστε τις συγκεντρώσεις κυκλοσπορίνης των δειγμάτων ασθενών με παρεμβολή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

Στην πράξη, τα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν σύστημα αναγωγής δεδομένων που βασίζεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η DiaSorin συνιστά να χρησιμοποιήσετε λογισμικό προσαρμογής καμπύλης είτε spline ή λογιστικό 4 παραμέτρων (4PL).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΜΗ χρησιμοποιήσετε γραμμική κλίμακα συγκέντρωσης (άξονας X) ή/και κλίματα logit B/B_0 (άξονας Y).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΝΑΓΩΓΗΣ

Το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου της DiaSorin χρησιμοποιεί προσαρμογή καμπύλης smooth spline.

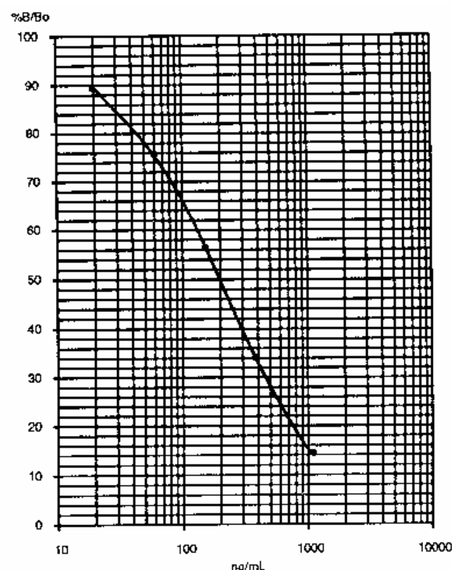
ΠΙΝΑΚΑΣ I

Δεδομένα δείγματος ολικού αίματος CYCLO-Trac SP της DiaSorin

Δοκ. σωλήνας	Πανομοιότυπο CPM	Μέσο CPM	Διορθωμένο CPM	Ποσοστό δέσμευσης (B/T)	Ποσοστό (B/B_0)	Συγκ. (ng/mL)
Συνολικές κρούσεις	51045	50892				
	50738					
NSB	1221	1328		2,6		
	1434					
Βαθμονομητής 0	25323	25432	24104	50,0		
	25541					
Βαθμονομητές (ng/mL)						
A (20)	22781	22806	21478		89,1	
	22830					
B (61)	19850	19624	18296		75,9	
	19397					
C (154)	14843	14911	13583		56,4	
	14978					
D (379)	9506	9570	8242		34,2	
	9633					
E (1099)	4893	4858	3530		14,6	
	4823					
Άγνωστα δείγματα						
1	16225	16122	14794		61,4	126
	16019					
2	9764	9570	8242		34,2	379
	9375					

Στον ΠΙΝΑΚΑ I και στο ΣΧΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τυπικά δεδομένα δείγματος και μια καμπύλη βαθμονόμησης. Οι πληροφορίες αυτές δίδονται μόνο για αναφορά και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό καμίας τιμής.

Καμπύλη βαθμονόμησης δείγματος ολικού αίματος CYCLO-Trac® SP



ΣΧΗΜΑ 1

13. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

13.1 Τα δείγματα δε θα πρέπει να καταψύχονται και να αποψύχονται επανειλημμένως.

13.2 Οι χρόνοι μέτρησης θα πρέπει να επαρκούν ώστε να αποφευχθεί το στατιστικό σφάλμα.

13.3 Μονοκλωνικά αντισώματα, όπως OKT3, έχουν αξιολογηθεί και βρέθηκε ότι δεν παρεμβαίνουν στον προσδιορισμό.

14. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα θεραπευτικά επίπεδα της κυκλοσπορίνης στο αίμα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού, καρδιάς και ήπατος δεν έχουν αποδειχθεί πλήρως. Αυτό οφείλεται εν μέρει στα διαφορετικά πρωτόκολλα θεραπείας όσον αφορά τις μεταμοσχεύσεις, τις διαθέσιμες μεθόδους για τη μέτρηση της κυκλοσπορίνης και την ταυτόχρονη χορήγηση άλλων ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων ταυτόχρονα με την κυκλοσπορίνη.[19, 30, 31]

Διεξήχθη κλινική αξιολόγηση με χρήση του κιτ για ολικό αίμα CYCLO-Trac SP σε πανεπιστημιακά νοσοκομεία στο Λονδίνο του Οντάριο και το Άλμπανι της Νέας Υόρκης σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού, καρδιάς και ήπατος. Οι αξιολογήσεις αυτές μέτρησαν τα χρονικά ελάχιστα επίπεδα κυκλοσπορίνης στο αίμα σε μεταμοσχευμένους ασθενείς. Στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο στο Λονδίνο του Οντάριο, οι χαμηλότερες τιμές στο αίμα παρατηρήθηκαν 4 έως 90 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού (n = 10), καρδιάς (n = 10) και ήπατος (n = 10). Επιπλέον, διεξήχθη παρόμοια αξιολόγηση σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού (n = 18) στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο στο Άλμπανι της Νέας Υόρκης. Στο Άλμπανι, τα χαμηλότερα επίπεδα στο αίμα παρατηρήθηκαν 199 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση.

Στον ΠΙΝΑΚΑ ΙΙ παρουσιάζονται οι μέσες τιμές κυκλοσπορίνης στο αίμα και σημαντικά συμβάντα (απόρριψη ή νεφροτοξικότητα) που παρατηρήθηκαν σε μεταμοσχευμένους ασθενείς από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο στο Λονδίνο του Οντάριο. Στο κέντρο αυτό, τα επίπεδα στο αίμα ασθενών διατηρήθηκαν σε 400 έως 650 ng/mL κυκλοσπορίνη ανάλογα με τον τύπο μεταμόσχευσης και την κλινική κατάσταση του ασθενή.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ

Χρονικές τιμές κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού, καρδιάς και ήπατος όπως μετρήθηκαν με το κιτ για ολικό αίμα CYCLO-Trac SP.

Ημέρα μετά την εγχείρηση	Νεφρά[α] CyA (ng/mL)				Καρδιά[β] CyA (ng/mL)				Liver[c] CyA (ng/mL)			
	N	Συμβάν	[δ]Μέσο	Τ.Α.	N	Συμβάν	[δ]Μέσο	Τ.Α.	. N	Συμβάν	[δ]Μέσο	Τ.Α.
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	8	2	438	269	9	-	161	115	-	-	-	-
7	10	3	392	138	10	-	326	176	9	-	372	111
11	9	6	428	207	10	-	563	119	10	-	496	136
14	10	5	387	219	10	-	598	162	10	1	620	231
21	10	3	487	283	10	5	505	185	10	-	478	109
30	9	3	416	163	9	4	450	102	10	1	608	217
60	9	1	579	474	9	3	482	171	8	1	437	66
90	9	1	252	105	8	1	433	173	8	-	347	102
Total events		24				13				3		

[α] Κυκλοσπορίνη 3,75 mg/kg έως 5 mg/kg ενδοφλέβια με αλλαγή στα 12 mg/kg σε δύο ισόποσες δόσεις το συντομότερο δυνατό, πρεδνιζόνη 2 έως 5 mg/kg με σταδιακή ελάττωση στα 20 mg/ημέρα, μεθυλοπρεδνιζολόνη 1 έως 2 mg/kg. Σε περίπτωση που δεν υπήρχε νεφρική λειτουργία, η χορήγηση της κυκλοσπορίνης διακόπηκε και χορηγήθηκαν 5 mg/kg OKT3 για 10 ημέρες.

[β] Η χορήγηση της κυκλοσπορίνης ξεκίνησε την 3η μετεγχειρητική ημέρα με 5 mg/κιλό σε δύο ισόποσες δόσεις, η χορήγηση 15 mg πρεδνιζόνης κάθε μέρα ελαττώθηκε σταδιακά, επιπλέον χορηγήθηκε αζαθειοπρίνη όπως ενδείκνυται, χορηγήθηκαν 50 mg/κιλό ALG μία φορά και η χορήγηση συνεχίζεται μόνο όπως ενδείκνυται, χορηγήθηκαν 5 mg/κιλό OKT3 ενδοφλέβια για 7 ημέρες όπως ενδείκνυται.

[γ] Η ενδοφλέβια χορήγηση κυκλοσπορίνης, αρχικά με δόση από το στόμα, ξεκίνησε την 5η ημέρα με 4 mg/κιλό και διατηρήθηκε στα επιθυμητά επίπεδα στο αίμα, η καθημερινή χορήγηση πρεδνιζόνης ελαττώθηκε σταδιακά, χορηγήθηκαν 2 έως 2,5 mg/κιλά αζαθειοπρίνη και διακόπηκαν όταν τα αιμοπετάλια ξεκίνησαν να ελαττώνονται, χορηγήθηκαν 500 mg μεθυλοπρεδνιζολόνη διεγχειρητικά και 15 mg ενδοφλέβια για 10 ημέρες, χορηγήθηκαν 5 mg/κιλό OKT3 για 10 ημέρες.

[δ] Νεφροτοξικότητα ή απόρριψη.

Στον ΠΙΝΑΚΑ ΙΙΙ παρουσιάζονται οι μέσες τιμές κυκλοσπορίνης στο αίμα και τα αντίστοιχα επίπεδα κρεατινίνης σε 18 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο στο Άλμπανι της Νέας Υόρκης.[32] Στο Άλμπανι, τα ελάχιστα επίπεδα κυκλοσπορίνης των ασθενών διατηρήθηκαν στα 100 έως 300 ng/mL.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ

Χρονικές τιμές κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα σε 18 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού όπως μετρήθηκαν με το κιτ για ολικό αίμα CYCLO-Trac SP.

	Ημέρα μετά την	Κυκλοσπορίνη (ng/mL)			Επίπεδα κρεατινίνης (mg/dL)				
Εβδομάδα	εγχείρηση	N[β]	Μέσο	Τ.Α.	Ν	Μέσο	Τ.Α.	ΕΛΑΧ.	ΜΕΓ.
1	0 εώς 7	12	151	128	143	4,9	4,0	0,7	18,0
2	8 εώς 14	16	185	96	125	2,7	2,2	1,1	8,2
3	15 εώς 21	19	173	94	94	2,7	1,9	1,1	9,4
4	22 εώς 28	17	198	146	76	3,0	1,9	1,1	8,5
5	29 εώς 35	22	210	168	70	2,9	1,7	1,2	8,2
6	36 εώς 42	17	164	63	68	2,5	1,1	1,1	5,6
7	43 εώς 49	14	175	53	55	2,4	1,1	1,1	5,4
8	50 εώς 56	17	198	99	42	2,1	1,0	1,2	5,4
9	57 εώς 63	16	176	54	40	3,1	2,7	1,0	10,9
10	64 εώς 70	4	199	59	34	3,5	3,3	0,9	11,7
11	71 εώς 77	18	146	73	27	3,0	3,1	0,9	11,1
12	78 εώς 84	5	142	76	18	3,5	3,3	1,1	11,2
13	85 εώς 91	1	304	-	7	4,2	0,3	3,6	4,6
14	92 εώς 98	1	317	-	10	3,4	1,1	1,7	4,8
15	99 εώς 105	2	121	10	9	4,1	1,6	2,0	5,5
16	106 εώς 112	1	49	-	5	5,4	2,5	1,7	8,7
17	113 εώς 119	1	79	-	3	1,6	0,1	1,6	1,7

[α] Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 2 έως 5 mg/κιλό κυκλοσπορίνη (κάθε δώδεκα ώρες), 4 mg/κιλό αζαθειοπρίνη προεγχειρητικά με ελάττωση σε 0,75 έως 1,0 mg/κιλό και μεθυλοπρεδνιζολόνη που χορηγήθηκε ως δόση εφόδου 300 mg και κατόπιν ρυθμίστηκε σε 20 mg/ημέρα έως 30 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση και σε 10 mg/ημέρα έως 60 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση.

[β] Ξεχωριστοί προσδιορισμοί κυκλοσπορίνης.

Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα κυκλοσπορίνης στο αίμα διατηρήθηκαν στα επιθυμητά επίπεδα αίματος για κάθε τύπο μεταμοσχεύσεων όπως ενδείκνυται για τα πρωτόκολλα μεταμοσχεύσεων που χρησιμοποιούνται από κάθε κέντρο.

Επειδή η κυκλοσπορίνη μπορεί να παράγει διαφορετικά επίπεδα στο αίμα σε διαφορετικούς ασθενείς, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την προσαρμογή της δοσολογίας της κυκλοσπορίνης πρέπει να ληφθούν υπόψη η περίοδος μετά τη μεταμόσχευση, άλλα φάρμακα που χορηγούνται και οι σχετικές κλινικές πληροφορίες που αφορούν τον ασθενή.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Τα ακόλουθα έχουν αναφερθεί από την Sandoz LTD. στο Μπάσελ της Ελβετίας όσον αφορά το φάρμακο Sandimmune® (κυκλοσπορίνη):

Η κυκλοσπορίνη υφίσταται εκτενή μεταβολισμό στο ήπαρ. Επομένως, το επίπεδό της στο ολικό αίμα ενδεχομένως να επηρεαστεί από φάρμακα που επηρεάζουν τα ηπατικά μικροσωμιακά ένζυμα, ιδιαίτερα το σύστημα κυτοχρώματος P-450. Οι ουσίες, για τις οποίες είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τα ένζυμα αυτά, θα μειώσουν τον ηπατικό μεταβολισμό και θα αυξήσουν τα επίπεδα κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα. Τα φάρμακα, για τα οποία έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν τη συγκέντρωση κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα, περιλαμβάνουν τη δαναζόλη, την κετοκοναζόλη, την ερυθρομυκίνη, την νικαρδιπίνη, τη διλτιαζέμη, τη μεθυλοτεστοστερόνη και τα από του στόματος χορηγούμενα αντισυλληπτικά. Οι ουσίες που αποτελούν επαγωγούς της δραστηριότητας του κυτοχρώματος P-450, θα αυξήσουν τον ηπατικό μεταβολισμό και θα μειώσουν τα επίπεδα κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα.

Τα φάρμακα, για τα οποία έχει αναφερθεί ότι μειώνουν τη συγκέντρωση της κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα, περιλαμβάνουν τη ριφαμπικίνη, τη φαινυτοΐνη, τη φαινοβαρβιτάλη, την ενδοφλέβια τριμεθοπρίμη με σουλφαμεθοξαζόλη και την καρβαμαζεπίνη. Όταν χορηγούνται ταυτόχρονα τα φάρμακα αυτά, η παρακολούθηση των επιπέδων κυκλοσπορίνης στο αίμα και η κατάλληλη αναπροσαρμογή της δόσης είναι απαραίτητες.

Βρέθηκε ότι η κάθαρση πρεδνιζολόνης μειώνεται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη και ότι τα επίπεδα κυκλοσπορίνης στο ολικό αίμα, όπως μετρώνται με RIA, αυξάνονται μετά από τη χορήγηση υψηλής δόσης μεθυλοπρεδνιζολόνης.

15. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

15.1 Ακρίβεια

Απόκλιση για τον ίδιο προσδιορισμό (τιμές = ng/mL)

	Μέση τιμή	Τ.Α.	%Σ.Δ.	N
ΧΑΜΗΛΗ	46	4,9	10,7	25
ΜΕΣΑΙΑ	186	6,0	3,2	25
ΥΨΗΛΗ	625	19,2	3,1	25

Αποτελέσματα της απόκλισης μεταξύ σειράς προσδιορισμών από μια πολυκεντρική μελέτη επάρκειας με χρήση δειγμάτων ολικού αίματος.

	Μέσος όρος κυκλοσπορίνης (ng/mL)	Τ.Α.	%Σ.Δ.	N
Κέντρο 1*	91	15,0	16,5	5
	203	27,9	13,7	5
	543	53,7	9,9	5
Κέντρο 2	71	6,7	9,5	5
	173	12,9	7,58	5
	466	41,5	8,9	5
Κέντρο 3	78	5,4	6,8	5
	195	18,4	9,4	5
	500	50,2	10,0	5
Κέντρο 4	87	6,9	7,9	5
	200	13,5	6,8	5
	505	42,5	8,4	5
Κέντρο 5	78	3,6	4,6	5
	192	10,2	5,3	5
	497	23,9	4,8	5

* Υποδεικνύει τη διακύμανσης μεταξύ σειράς προσδιορισμών που συναντώνται σε εργαστήριο που μόλις ξεκίνησε να εκτελεί ραδιοαναοσοπροσδιορισμούς.

15.2 ΑΛΗΘΙΝΟΤΗΤΑ: Η ΑΛΗΘΙΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΧΕΙ ΕΛΕΓΧΘΕΙ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ.

Γραμμικότητα (Παραλληλισμός)

Μέση ανάκτηση για 30 δείγματα ασθενή αραιωμένα διαφορετικά με ορό (περιοχή τιμών συγκέντρωσης 132 έως 1716 ng/mL).

$$\% \text{ Ανάκτηση} = 100 \text{ x } \frac{\text{(συντελεστής αραίωσης x τιμή αραιωμένου δείγματος}}{\text{(τιμή σκέτου δείγματος)}}$$

Αραίωση	1/2	1/4	1/8
% Ανάκτηση	96,1	93,3	95,9
Τ.Α.	13,7	19,2	22,6
%Σ.Δ.	14,3	20,6	23,6

Ακρίβεια

Μελέτη ανάκτησης: Μέσες ανακτήσεις σε 3 επίπεδα προστιθέμενης κυκλοσπορίνης για 5 δείγματα, 6 επαναλήψεις το κάθε ένα (n=30).

	Κυκλοσπορίνη που προστέθηκε (ng/mL)	% Ανάκτηση	Τ.Α.	% Σ.Δ.
Επίπεδο 1	95	119	17	14
Επίπεδο 1	212	109	11	10
Επίπεδο 1	467	97	7	7

15.3 Αναλυτική ευαισθησία (όρια ανίχνευσης)

Όταν ορίζεται ως η φαινομενική συγκέντρωση σε τρεις τυπικές αποκλίσεις από τις κρούσεις σε μέγιστη δέσμευση, η μέση ευαισθησία του προσδιορισμού στο ολικό αίμα CYCLO-Trac SP είναι 8,7 ng/mL (n=20).

15.4 Αναλυτική ειδικότητα

Μέση διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των μεταβολιτών κυκλοσπορίνης στον προσδιορισμό στο ολικό αίμα CYCLO-Trac SP. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ορίζεται ως εξής:

$$100 \text{ x } \frac{\text{(Συγκέντρωση κυκλοσπορίνης στο 50\% } B/B_0)}{\text{(Συγκέντρωση μεταβολίτη στο 50\% } B/B_0)}$$

Μεταβολίτης κυκλοσπορίνης	% διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
1	1,7
8	<0,1
13	0,1
17	0,7
18	0,2
21	0,8

15.5 Παρεμβολή

Οι ακόλουθες ουσίες προστέθηκαν σε κλάσματα ενός μίγματος ολικού αίματος που περιείχε κυκλοσπορίνη (160 έως 250 ng/mL). Καμία από τις ουσίες αυτές δεν παρέμβει με τη μέτρηση κυκλοσπορίνης όταν υπήρχε στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται παρακάτω.

Ουσία	**Συγκέντρωση**
Χοληστερόλη	100 έως 1000 mg/dL
Τριγλυκερίδια	300 έως 1000 mg/dL
Χολερυθρίνη	5 έως 30 mg/dL
Αζαθειοπρίνη	50 έως 200 ng/mL
Σιμετιδίνη	500 έως 1000 ng/mL
Νιφεπιδίνη	100 έως 200 ng/mL
6-μεθυλ-πρεδνιζολόνη	20 έως 60 ng/mL
OKT3	1500 ng/mL

Τα συγχορηγούμενα φάρμακα στον παρακάτω κατάλογο έχουν ελεγχθεί σε επίπεδα που φτάνουν τα 100 μg/mL και βρέθηκε ότι δεν παρεμβαίνουν στον προσδιορισμό:

Ακεταμινοφαίνη	Λιδοκαΐνη
N-ακετυλοπροκαϊναμίδιο	Μετοκλοπραμίδη
Κεφαλοσπορίνες	Ναφκιλλίνη
Χλωραμφενικόλη	Πενικιλλίνη
Διγοξίνη	Προπρανολόλη
Δισοπυραμίδη	Ριφαμπικίνη
Αιθοσουξιμίδη	Σαλικυλικό οξύ
Θειική γενταμυκίνη	Τομπραμυκίνη
Καναμυκίνη	Βεραπαμίλη

Σύγκριση του προσδιορισμού στο ολικό αίμα CYCLO-Trac SP DiaSorin με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Μελέτη	Τύπος μεταμόσχευσης	Γραμμική εξίσωση	Συντελεστής παλινδρόμησης	n
Φαρμακοκινητική	Δ/Υ	Y = 0,9121X + 47	r = 0,9719	373
Πανεπιστήμιο της Πενσιλβάνιας	Νεφρό Καρδιά Ήπαρ	Y = 0,8022X + 34 Y = 0,9196X + 50 Y = 0,9572X + 48	r = 0,9585 r = 0,9223 r = 0,9067	82 42 40
Ιατρικό Κέντρο του Άλμπανι	Νεφρό	Y = 1,038X + 27	r = 0,9124	187
Πανεπιστήμιο του Δυτικού Οντάριο	Νεφρό Καρδιά Ήπαρ	Y = 1,3074X + 29 Y = 1,4672X + 16 Y = 1,3575X - 12	r = 0,9703 r = 0,9696 r = 0,9067	73 75 63

Τα δεδομένα συσχέτισης που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα μελετών που διεξήχθησαν σε πολυάριθμα εργαστήρια με χρήση διαδικασιών υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) οι οποίες έχουν πιστοποιηθεί ανεξάρτητα. Δε θα πρέπει να γίνουν συγκρίσεις με τα δεδομένα αυτά και τυχόν σύγκριση των μεθόδων θα πρέπει να γίνεται μόνο εφόσον έχει επιτευχθεί προσεχτική τυποποίηση των μεθόδων.

ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ, ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ

REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/ REFERÊNCIAS/REFERENSER/IRODALOM/ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tutschka, P.J., "Cyclosporin A as a Tool for Experimental and Clinical Transplation," **Biomedicine,** 36:341, (1982).
2. Tutschka, P.J., "Cyclosporin A-Immunobiological Aspects," **Hepatology,** 2 (5):645,(1982).
3. Britton, S. and R. Palacios, "Cyclosporin A-Usefulness, Risks and Mechanism of Action," **Immunological Review,** 65:5, (1982).
4. Keown, P.A., G.L. Essery, C.R. Stiller, N.R. Sinclair, R. Mullen and R.A. Ulan, "Mechanisms of Immunosuppression by Cyclosporin," **Transplantation Proceedings,** 13 (1):386, (1981).
5. White, D.J.G., "Cyclosporin A Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential, "**Drugs,** 24:332, (1982).
6. Merion, R.M., D.J. White, S. Thiru, D.B. Evans, and R.Y. Calne, "Cyclosporine: Five Year's Experience in Cadaveric Renal Transplantation," **New England Journal of Medicine,** 310 (3), 148-54, (1984).
7. Bieber, C., et. al., **Heart Transplantation,** (3), 81, (1983).
8. Busuttil, R.W., L.I. Goldstein, G.M. Danovich, M.E. Ament and L.D. Memsic, "Liver Transplantation Today," **Annals of Internal Medicine,** 104 (3), 337-389, (1986).
9. Cohen, D.J., "Cyclosporine: Clinical Applications and Monitoring Methods," **Laboratory Management,** pp. 29-34, (1985).
10. Sells, R.A., **Transplantation Proc.,** 15, 2495, (1983).
11. Albrechtsen, D., G. Soedal, K.J. Berg, H. Bondevik, I.B. Brekke, P. Fauchald, A. Jakobsen, B.R. Opedal, H.E. Rugstad, E. Thorsby, et. al., "Cyclosporine in Living Related and Cadaveric Renal Transplantation," **Transplantation Proc.,** 16 (5), 1911-4, (1984).
12. Atkinson, K., et. al., **Transplantation Proc.,** 15, 2761, (1983).
13. Hows, J.M., P.M. Chipping, S. Fairhead, J. Smith, A. Baughan and E.C. Gordon-Smith, "Nephrotoxicity in Bone Marrow Transplant Recipients Treated with Cyclo-sporin A," **Br. J. Haematol,** 54 (1), 69-78, (1983).
14. Kahan, B.D., C.A. Wideman, M. Reid, S. Gibbons, M. Jarowenko, S. Flechner and C.T. Van Buren, "The Value of Serial Serum Trough Cyclosporine Levels in Human Renal Transplantation," **Transplantation Proc.,** 16 (5), 1195-9, (1984).
15. Keown, P.A. and et. al., "In: Transplantation and Clinical Immunology," **Excerpta Medica,** Vol. 13, J.L. Toursine (Ed.), pp. 34, (1981).
16. Bowers, L.D. and D.M. Canafax, "Cyclosporine: Experience with Therapeutic Monitoring," **Therapeutic Drug Monitoring,** 6 (2), 142-7, (1984). See also D.J. Freeman, Am. R. Cell, **Phys. Surg. Can.,** 17, 301, (1984).
17. Giacherio, D. and T. Annesley, "Cyclosporin: Monitoring the Dosage of a New Immuno-suppressant," **MediLab,** April/May, pp. 20-25, (1985).
18. Kahan, B.D., et. al., **Transplantation Proc.,** 15, 446, (1983).
19. "National Academy of Clinical Biochemistry/American Association for Clinical Chemistry Task Force on Cyclosporine Monitoring," **Clinical Chemistry,** 33 (7), 1269-88, (1987).
20. Yatscoff, R.W., D.N. Rush and J.R. Jeffery, "Effects of Sample Preparation on Con-centrations of Cyclosporin A Measured in Plasma," **Clinical Chemistry,** 30 (11): 1812, (1984).
21. Annesly, T., K. Matz, D. Giacherio and C. Feldkamp, "Cyclosporine Distribution in Blood: Concomitant Effect of Hematocrit, Concentration, Metabolites and Temperature," **Journal of Clinical Immunoassay,** 10 (4), 226-231, (1987).

22. Annesly, T.M., D.A. Giacherio and C.S. Feldkamp, "The Concentration Related Distribution of Cyclosporine in Blood," **The Journal of Clinical Immunoassay,** 9 (1), Spring (1986).

23. Donatsch, P., E. Abisch, M. Homberger, R. Traber, M. Trapp and R. Voges, "A Radioimmunoassay to Measure Cyclosporin A in Plasma and Serum Samples," **Journal of Immunoassay,** 2 (1), 19-32, (1981).

24. Lensmeyer, G.L. and B.L. Fields, **Clinical Chemistry,** 31, 196, (1985).

25. Ball, P.E., H. Munzer, H.P. Keller, E. Abisch and J. Rosenthaler, "Specific ^{3}H Radioimmunoassay with a Monoclonal Antibody for Monitoring Cyclosporine in Blood," **Clinical Chemistry,** 34:257-261, (1988).

26. Holt, D.W., A. Johnston, J.T. Marsden, L. Vernillet, P.A. Keown, T.G. Rosano, L.M. Shaw and J. Rosenthaler, "Monoclonal Antibodies for Radioimmunoassay of Cyclosporine: a Multicenter Comparison of Their Performance with the Sandoz Polyclonal Radioimmunoassay Kit," **Clinical Chemistry,** 34 (6):1091-6, (1988).

27. Potter, J.M. and H. Self, "Cyclosporin A: Variation in Whole Blood Levels Related to In Vitro Anticoagulant Usage," **Therapeutic Drug Monitoring,** 8 (1): 122-123, (1986).

28. Hows, J.M., and J.M. Smith, "In Vitro Stability of Cyclosporin," **Journal of Clinical Pathology,** 36:720-721, (1983).

29. Rudy, J.L. and J. Ruthledge, "Preparation and Optimal Storage of a Whole Blood Control Pool for Cyclosporin A," **Clinical Chemistry,** 32:2204-5, (1986).

30. Shaw L, "Advances in Cyclosporine Pharmacology, Measurement and Therapeutic Monitoring," **Clinical Chemistry,** 35 (7):1299-1308, (1989).

31. Moger, T., G. Post, S. Stevioff and C. Anderson, "Cyclosporine Nephrotoxicity is Minimized by Adjusting Dosage on the Basis of Drug Concentration in Blood," **Mayo Clinic Proc.,** 63:241-274, (1988).

32. Rosano T.G., B.M. Freed, M.A. Pell and N. Lempert, "Cyclosporine Metabolites in Human Blood and Renal Tissue," **Transplant Proceedings,** 18 p(6) Suppl. 5:35-40, (1986).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitäts-kennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbar-keitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanwei-sung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
Ab	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisuero	Antisiero
Ag ^{125}I	Tracer: antigen labelled with ^{125}I	Traceur : antigène marqué à l'iode ^{125}	Tracer: ^{125}I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ^{125}I	Tracciatore: antigene etichettato con ^{125}I
BUF	Buffer	Tampon	Puffer	Tampón	Tampone
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
Xn	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português	Svenska	Magyar	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europeisk överensstämmeise	Európai Megfelelőség	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Prazo de validade	Utgångsdatum	Lejárati idő	Ημερομηνία Λήξης
	Fabricante	Tilverkare	Gyártó	Κατασκευαστής
	Consulte as instruções de utilização	Se bruksanvisningen	Felhasználói útmutató	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
IVD	Diagnóstico in vitro.	Diagnostik in vitro.	In vitro diagnosztika.	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
LOT	N.º do lote	Batch-nummer	Lot –szám	Αρ. παρτίδας
	Limite de temperatura.	Temperatur-begränsning.	Hőmérsékleti tartomány	Περιορισμοί θερμοκρασίας
Ab	Anti-soro	Antiserum	Antiszérum	Αντιορός
Ag ^{125}I	Traçador: antígeno marcado com ^{125}I	Spårelement: antigen betecknad med ^{125}I	Tracer: ^{125}I-el jelölt antitest	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σημασμένο με ^{125}I
BUF	Tampão	Buffert	Puffer	Ρυθμιστικό διάλυμα
CAL	Calibrador	Kalibrator	Kalibrátor	Βαθμονομητής
CONTROL	Soro de controlo	Kontrollserum	Kontroll szérum	Ορός μάρτυρα
	Radioactivo	Radioaktiv	Radioaktív	Ραδιενεργό
Xn	Nocivo	Skadligt	Veszélyes	Επιβλαβής







DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

28711
11598 12/04

PRINTED IN U.S.A.